

이학석사 학위논문

해수 어류에서 분리된 *Vibrio*군의
tetracycline 내성 유전자 특성

지도교수 이학석

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함



2004년 2월

부경대학교 대학원

어 병 학 과

김 영 화

김영화의 이학석사 학위논문을 인준함

2003년 12월 26일

주 심 이 학 박 사 김 기 홍



위 원 농 학 박 사 박 수 일



위 원 이 학 박 사 정 현 도



목 차

I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	5
1. 실험 균주	5
2. 약제 감수성 실험	6
3. Polymerase Chain Reaction (PCR)	7
3. 1. Total nucleic acid 분리	7
3. 2. Primer 제작	8
3. 3. PCR과 multiplex PCR	10
4. Gel Elution	11
5. Cloning	12
6. Plasmid 분리	13
7. 염기 서열 분석	14
8. <i>tet(M)</i> 의 분자적 구조 분석	14
9. <i>Vibrio</i> spp.에서 분리한 <i>tet(B)</i> 와 <i>tet(M)</i> 의 상대적 위치 확인	16
III. 결 과	19
1. 내성 균주의 분리	19
2. PCR에 의한 tetracycline 내성 유전자의 증폭	22
2. 1. Multiplex PCR 기법을 통한 efflux gene의 검출	22
2. 2. <i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> 의 확인	25
2. 3. <i>Vibrio</i> spp. 내의 <i>tet(B)</i> 와 <i>tet(M)</i> 의 화증	27

3. Ribosomal protection gene인 <i>tet</i> (M)의 분자적 구조 분석	29
3. 1. <i>tet</i> (M)의 염기 서열 분석	29
3. 2. <i>tet</i> (M)의 type 구별	33
3. 3. <i>Vibrio</i> spp.의 <i>tet</i> (M) 분석	36
4. <i>Vibrio</i> spp.에서 검출된 <i>tet</i> (B)와 <i>tet</i> (M)의 관계 분석	39
4. 1. <i>tet</i> (B)와 <i>tet</i> (M)의 거리 확인	39
4. 2. <i>tet</i> (B)와 <i>tet</i> (M) 사이의 염기 서열 분석	41
IV. 고 찰	43
V. 요 약	53
VI. 감사의 글	55
VII. 참고 문헌	57

Characterization of tetracycline resistance genes in *Vibrio* spp.

isolated from marine fishes

Young-Hwa Kim

Department of Fish Pathology, Graduate School,

Pukyong National University

Abstract

Tetracycline (Tc) is one of the most popular antibiotics using in aquatic industry of the world. Usage of tetracycline and tetracycline analogs was caused the appearance of Tc resistance bacteria by the acquisition of tetracycline resistance genes (*tet* genes). Thus, the understanding of molecular characterization of *tet* genes is important to understand the appearance of tetracycline resistant bacteria in fish pathogenic bacteria.

Total of 16 enterobacteria and 32 *Vibrio* spp. were isolated from the intestinal tract of marine fish and aquatic environments of Korea to determine the dissemination of the *tet* genes using a polymerase chain reaction (PCR) assay. Unlike the enterobacterial isolates appeared to contain various types of *tet* gene, all *Vibrio* spp. were positive for only *tet*(B) in multiplex PCR that can discriminate six different *tet* genes, *tet*(A), *tet*(B), *tet*(C), *tet*(D), *tet*(E) and *tet*(G) encoding the efflux

proteins. The most unexpected finding in further analysis for *tet(K)*, *tet(L)* and *tet(M)* was that all *Vibrio* spp. examined also carried *tet(M)* with *tet(B)*. Thus in *Vibrio* spp., found in Korea, both *tet(B)* and *tet(M)* genes are highly disseminated as a determinant of tetracycline resistance. Additionally, by the different sizes of the amplicons, multiplex PCR with the primers derives from the variable and conserved regions of two major prototypes of *tet(M)* gene, *Tn1545* and *Tn916*, allowed us to confirm that all tetracycline resistant isolates of *Vibrio* spp. from the aquatic environments of Korea carried *tet(M)* gene derived from the conjugative transposon *Tn1545*, whereas an enterobacterial strain CJV23 derived from *Tn916*. The full length DNA nucleotide sequence of *tet(M)* in *Vibrio* spp. and CJV23 and compared with that of *tet(M)* present in *Tn1545* and *Tn916*.

The relative location of *tet(B)* and *tet(M)* were examined using the PCR method with the different combination of primer sets derived from *tet(B)* and *tet(M)* to produce amplicons depend upon the orientation and distance of these two genes on DNA. The amplicon was generated using the one primer designed from the nucleotide sequences of *tet(B)* gene and other from *tet(M)* genes. It came out that *tet(M)* gene was located 2,536bp apart from the 3' end of *tet(B)* gene or just 3' end of IS10 sequence of *Tn10* contained *tet(B)* gene. This report is the first detailed description of the *tet(M)* gene in *Vibrio* spp. and further studies are necessary to confirm the transmission and expression of *tet(M)*.

I. 서 론

세균성 질병에 대한 대책으로, 미생물이 자연적으로 생산해내는 저분자 물질이며, 다른 세균의 질병을 억제하는 항생물질들이 1928년 penicillin을 시작으로 지속적으로 발견되고, 각각의 항생물질에 대한 수많은 유도체가 개발되어 사용되어 왔다. 이러한 항생물질은 사람에서 뿐 아니라, 세균성 질병의 발생률이 높은 어류 양식업에서도 여러 가지 세균성 질병 치료와 성장 촉진을 위해 사용되었다. 항생제의 사용은 많은 질병으로부터 어류를 구제하는 이점을 가져왔으나, 한편으로는 항생제에 대해 저항성을 나타내는 세균의 증가, 어류에서 사람에게로의 내성의 전이, 다제 내성을 지닌 세균의 출현 등과 같은, 항생제 내성에 관련된 여러 가지의 부수적인 문제점들이 발생하게 하였다.

우리 나라에서는 수산용 항생제 사용에 대한 규제 및 항생제 사용자에 대한 전문적인 교육이 선진국에 비해 특별히 실시되지 않고 있어서, 여러 종류의 항생제가 다량으로 사용되고 있다. 그러나 미국과 유럽에서는 항생제를 제한하여 사용하고 있는데, 이렇듯 제한적인 항생제의 사용이 필요한 이유는, 항생제의 지속적인 사용에 따른 부작용으로 인해, 어류 양식에서 점점 더 많은 양의 항생제가 사용되어지면서, 또 다시 어류 질병 원인 균의 약제 내성 발생 및 전파가 급속도로 일어나게 되는 결과를 낳기 때문이다. 세계 보건 기구 (World Health Organization, WHO)는 2003년에 여러 항생제에 대한 저항성을 지니는 슈퍼박테리아의 출현과 그에 따른 문제점들을 막기 위해, 질병 치료의 목적 뿐 아니라 가축 및 어류의 사료에 동물 성장 촉진 등의 목적으로 사용되는 항생제일지라

도 그 사용을 자제해 줄 것을 권고한 바 있다.

수산업에서 널리 사용되고 있는 대표적인 항생제인 tetracycline (Tc)는, acetate와 malonate가 환을 형성하여, 4개의 연결된 환을 그 모핵으로 가지고 있는 구조로, 세균의 ribosome의 30S subunit에 결합하여, aminoacyl tRNA가 50S subunit의 acceptor site와 결합하는 것을 방해하는 방법으로 단백질 합성을 억제시키는 작용에 의한 정균 능력을 나타낸다 (Roberts, 1996). Gram 양성 세균 및 gram 음성 세균, *Rickettsia*, *Mycoplasma*, *Chlamydia* 및 몇몇 protozoa 등에 널리 작용하는 광역성 항생물질이기 때문에, 수산용 항생제에서 매우 중요한 위치를 차지하고 있다 (정과 전, 1992).

현재 tetracycline, oxytetracycline, chlorotetracycline, doxycycline, minocycline 등 수많은 tetracycline계 항생제가 어류 질병의 치료제로써 널리 이용되고 있으며, 가격이나 효과 측면에서 고려하였을 때, 양어장에서 가장 빈번하게 사용되고 있는 oxytetracycline과 chlortetracycline은, Atlantic salmon의 냉수성 미브리오병과 구직병, chinook salmon의 rosette병, Flavobacteria병, furunculosis, 부지개송어의 콜롬나리스병 및 연쇄구균병 등 많은 어병의 치료를 위해 사용되고 있다.

Tetracycline 계 약물의 사용으로 인해, Tc에 대해서 저항성을 나타내는 내성균 또한 많이 나타나게 되었는데, 내성균이 지니고 있는 테트라사이클린 내성 유전자인 *tet* gene은, 다음과 같은 세 가지의 기작에 의해 내성을 나타낸다. (1) 내재성 막 단백질에 의해 일어나는 Tc의 energy 의존성 efflux를 통해 Tc를 밖으로 내보내어 ribosome에 Tc가 축적되는 것을 막음으로써 (efflux), (2) 용해성 단백질에 의해 Tc가 붙지 못하도록 ribosome을 변형시킴으로써

(ribosomal protection), (3) Tc를 분할성화 시키는 효소를 만들어 냅으로써 (enzymatic) 내성을 나타낸다 (Levy, 1992 ; Chopra & Roberts, 2001). 그밖에도 Tc에 대해 내성을 지니고 있으나 그 기작에 대해 정확히 밝혀지지 않은 것 또한 존재한다. 내성 기작에 따라 tetracycline 내성 유전자인 *tet* gene을 분류할 수 있는데 먼저, efflux에는 *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(G)*, *tet(H)*, *tet(I)*, *tet(J)*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(Z)* 등이, ribosomal protection에는 *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(Q)*, *tet(S)*, *tet(T)*, *tet(W)* 등이 있으며, 효소적인 기능을 하는 것에는 *tet(X)*가 있는 것으로 알려져 있다 (Levy *et al.*, 1999).

각종 세균에는 *tet* gene이 존재하며, tetracycline 저항성 유전자는 세균의 종류에 따라 다른 것으로 알려져 있으며 (Roberts, M. C., 1989 ; Roberts *et al.*, 1990), *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)* 및 *tet(G)*가 다수의 gram 음성 세균에 분포한다는 것이 보고된 바 있다 (Chopra & Roberts, 2001). 현재 까지 각종 세균에서 tetracycline 저항성에 관여하는 유전자가 많이 보고되어 있는데 (Khan *et al.*, 1983 ; Levy S. B., 1988), 그 중 대표적인 ribosomal protection gene인 *tet(M)*은 gram 양성 세균 및 음성 세균, 그리고 세포벽이 없는 *mycoplasma*에서 저항성을 전달하는 유전자로 알려져 있다 (Burdett V., 1986 ; Clewell *et al.*, 1986 ; Roberts *et al.*, 1988). 각종 세균에서 *tet(M)* 유전자의 존재 부위도 세균의 종류에 따라 서로 다르며 (Khan *et al.*, 1983 ; Levy, 1988), *Gardnella vaginalis* 등의 세균에서는 염색체 DNA상에 *tet(M)* 유전자가 존재하고 (Knapp *et al.*, 1988 ; Roberts *et al.*, 1986 ; Roberts *et al.*, 1988), *Neisseria gonorrhoeae* 등의 세균에서는 conjugative transposon 상에 *tet(M)* 유전자가 존재하며 (Knapp *et al.*, 1988 ; Morse *et al.*, 1986),

Mycoplasma sp. 에서는 염색체의 DNA에 *tet*(M) 유전자가 존재하는 것으로 보고되고 있다 (Bergeman *et al.*, 1988 ; Brown *et al.*, 1987 ; Roberts *et al.*, 1986).

이전에 몇몇 테트라사이클린 내성 균주들의 내성 유전자에 대한 연구가 있었으나 세균의 종에 따라 마흡한 면이 많은 실정이며, *tet* gene을 검출하는 기법은 *tet* probes를 제작하여 DNA-DNA hybridization을 통하여 내성 유전자의 종류를 확인하는 방법으로서, 실험과정이 어렵고 시간이 많이 소비되는 단점이 있었다 (DePaola *et al.*, 1988 ; Marshall *et al.*, 1983 ; Lee *et al.*, 1993). 해양 환경에서 어류 질병을 일으키는 세균에는 *Vibrio* spp., *Edwardsiella tarda*, *Aeromonas hydrophilla*를 포함한 많은 종류의 세균들이 있으며 (김, 1997), 앞으로 *tet* gene과 같은 내성 유전자들을 지닌 어병 세균에 의해 항생제를 많이 사용하는 양식 현장에서 피해를 입을 것으로 예상된다. 이에, 본 연구에서는 (1) 병어, 해수, 그리고 정상어의 장 등 다양한 양식 환경으로부터 tetracycline에 대하여 내성을 지니고 있는 균주들을 분리하고, (2) 대표적인 어병 세균인 *Vibrio*균과 정상어의 장내세균들이 어떠한 *tet* gene을 지니고 있는지 확인해보고자 하였다. 그리고 (3) *Vibrio*균에서 분리한 tetracycline 내성 유전자의 분자적인 특성을 PCR 기법을 이용하여 분석하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 균주

본 실험에서 사용된 균주들은, 1993년에서 2003년의 기간 동안, 우리 나라 여러 지역의 병어, 해수 그리고 정상어의 장내 세균총으로부터 분리하였다. 균의 분리 및 증균을 위하여 Tryptic Soy Broth (TBS, Difco) 및 Tryptic Soy Agar (TSA, Difco)를 사용하였으며 필요에 따라 1%의 NaCl을 첨가하여 배양하였다. *Vibrio* spp.는 25℃에서, 장내세균은 37℃에서 각각 16시간 배양한 후 균수를 측정하기 위해 분광 광도계 (Spectrophotometer, UVIKON, KONTRON INSTRUMENT)에서 OD₆₀₀값을 구한 후 실험에 사용하였다. 균의 동정을 위해서는 선택 배지인 Thiosulfate citrate bile salts sucrose agar (TCBS, Difco) 및 Chromocult coliform agar (CC, Merck)를 사용하였는데, *Vibrio* spp.는 비브리오 선택 배지인 TCBS 평판 배지상에서 노란색 혹은 초록색의 집락을 형성하며, CC 평판 배지에서 증식하지 않는 것으로 규정하였다. 장내 세균은 TCBS에서는 성장을 하지 않고, CC 평판 배지에서 독특한 색을 띠며 성장하는 것으로 결정하였다. 세부적인 균의 동정을 위해서는 선택배지의 사용과 더불어 API 20E system (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France)를 이용하였으며, 테트라사이클린에 대한 내성이 있는 균을 분리하기 위해서, Tc가 10µg/ml 첨가된 Mueller-Hinton agar (MH, Difco)가 사용되었다. 또한 실험균의 보존을 위해 배양액에 20% Glycerol (Sigma, USA)를 첨가한 후, -70℃에

시 사용 전까지 보관하였다.

2. 약제 감수성 실험

실험 균주가 지니고 있는 항생제에 대한 내성의 정도를 알아보기 위하여, Ampicillin (Am), Ciprofloxacin (Ci), Chloramphenicol (Cm), Gentamycin (G), Minocycline (M), Nalidixic Acid (NA), Oxolinic Acid (OA), Penicillin (Pe), Tetracycline (Tc), Streptomycin (St)을 사용하여 약제 감수성 시험을 실시하였으며, 사용된 항생제는 모두 Sigma에서 구입하여 사용하였다.

채집 균주의 항생제에 대한 최소 증식 저지 농도 (Minimal Inhibition Concentrations, MICs) 값은 Broth dilution method에 의하여 측정되었다 (김, 1997). 먼저, 96 wells plate에 멸균된 Mueller Hinton Broth (MH broth, Difco)를 160 μ l 넣고, 각 농도로 1:2 씩 여리 단계로 희석된 항생제 20 μ l와, MH broth에 10⁷cells/ml로 현탁된 균액을 20 μ l 넣었다. Positive control로는, MH broth 180 μ l와 현탁된 균액 20 μ l을, negative control로는 MH broth만 200 μ l를 넣어주었다. 각 균의 적온에서 18시간 배양한 후, MIC 값은 세균의 증식에 따른 액체 배지의 혼탁도를 관찰하여, 육안적으로 세균의 증식이 억제되는 항생제의 가장 낮은 농도로 결정되었다.

3. Polymerase Chain Reaction (PCR)

3. 1. Total nucleic acid 분리

Total nucleic acid의 분리는, Phenol/Chloroform 법을 사용하였다. 먼저 실험에 사용할 균을 Tryptic Soy Broth (TSB, Difco)에 접종하여, 각각의 균의 적온인 25℃ 혹은 37℃에서 18시간 배양시킨다. 배양 후, 배양액 1.5ml을 취하여 microtube에 분주하고, 12000rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 균을 모았다. TE buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA) 600 μ l에 현탁시킨 후, 20% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate, USB) 20 μ l 및 20mg/ml의 proteinase K 5 μ l를 첨가하여 37℃에서 1시간동안 lysis시켜 세포벽을 제거시킨다. 반응 후 lysates에, 5M Sodium Chloride (NaCl)를 100 μ l 첨가한 후 잘 섞어주었다. 총 혼합액에 동량의 Phenol : Chloroform : Isoamylalcohol (25 : 24 : 1, Sigma, USA)을 넣어준 후, vortexing하여 층이 없도록 조심스럽게 섞은 후, 12,000 rpm, 10분 동안 원심분리하였다. 상층액을 새 microtube로 옮기고, 이와 같이 2번 더 추출하여, DNA가 녹아있는 수용액 층을 단백질 성분으로부터 분리하였다.

위의 수용액 층에, 2배 volume의 99.99% ethanol (Sigma, USA) 및 0.3M Sodium Acetate를 넣고, inverting하여 혼합한 후, -70℃에서 1시간동안 침전하였다. 12000rpm, 4℃, 10분 동안 원심 분리하여 상층액을 제거하고, 70% ethanol로 다시 12000rpm, 4℃, 10분간 원심 분리하는 washing 과정을 거친다. 상층액을 완전히 제거한 후, 10분간 자연 건조시켜, 50 μ l의 distilled water에 재현탁시켰다 (Chen & Kuo, 1993).

현탁시킨 DNA는, 분광 광도계 (spectrophotometer, UVIKON, KONTRON INSTRUMENTS, S.P.A., Milan, Italy)를 사용하여 흡광도 측정으로 A_{260}/A_{280nm} 값을 구하여 DNA 양을 측정한 후 실험에 사용하였다.

3. 2. Primer 제작

본 연구에서 사용된 primer sets는, *tet* gene 중 efflux 기능을 수행하는 것과 ribosomal protection 기능을 수행하는 것을 검출하기 위하여, 각각의 염기 서열로부터 특이적으로 제작되어 사용되었다. 먼저, efflux *tet* gene을 검출하기 위한 multiplex PCR용 primer sets는 이전의 연구에서 *tet*(A), *tet*(B), *tet*(C), *tet*(D), *tet*(E), *tet*(G)를 검출하기 위해 제작된 1개의 forward primer와 각 *tet* gene에 따른 여섯 개의 reverse primers를 사용하였다 (전, 2003). 그리고, 마찬가지로 efflux *tet* gene인 *tet*(K)와 *tet*(L)의 존재 여부를 확인하기 위해서, Genbank (NCBI)로부터, 여러 종류의 세균에 존재하는 *tet*(K) 및 *tet*(L)의 염기 서열을 얻은 후, MACAW program (Version 2.0.5., National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda, ND, USA)을 이용하여 비교하여 서로 다른 *tet* gene에 결합할 수 있도록 sense primer와 antisense primer를 제작하였다. 마찬가지로, 가장 대표적인 ribosomal protection gene인 *tet*(M)에 대해서도 특이적으로 결합할 수 있는 primer set을 제작하였다. 본 실험에서 사용된 *tet* gene을 검출하기 위해 사용된 primers의 염기 서열과 예상되는 증폭 산물의 크기를 다음의 table 1에 나타내었다.

Table 1. Primers and expected sizes of PCR amplicons for various *tet* genes

Primer	<i>tet</i> genes	Oligonucleotide sequence (5'-3')	Expected sizes	Accession No.
TETF	<i>tet</i> (A) to <i>tet</i> (G)	GCGCTNTATGCGTTGATGCA		
TAR	<i>tet</i> (A)	ACAGCCCGTCAGGAAATT	387bp	X0006
TBR	<i>tet</i> (B)	TGAAAGCAAACGGCCTAA	171bp	J01830
TCR	<i>tet</i> (C)	CGTGCAAGATTCCGAATA	631bp	J01749
TDR	<i>tet</i> (D)	CCAGAGGTTTAAGCAGTGT	489bp	X65876
TER	<i>tet</i> (E)	ATGTGTCCTGGATTCTT	246bp	L06940
TGR	<i>tet</i> (G)	ATGCCAACACCCCCGGCG	803bp	S52437
TKF	<i>tet</i> (K)	GTAATGGTACCTGGTAAATC	329bp	S74032
TKR		CTATTACCTATTGTCGCTAC		
TLF	<i>tet</i> (L)	GATCGATAGTAGCCATGG	480bp	U17153
TLR		CTTCTATCAACAAGTATC		
TMF	<i>tet</i> (M)	GAATCTGAACAATGGGAT	1099bp	U09422
TMR		CTAACAATTCTGTTCCAGC		

3. 3. PCR과 multiplex PCR

PCR을 위하여, 0.2ml microtube에, 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001% w/v gelatin, 0.5% Tween-20, 200μM의 각각의 dNTP, 1μM의 각각의 primer, 1.25U AmpliTaq DNA polymerase (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) 및 template DNA로써 추출한 세균의 total nucleic acid를 1ng을 첨가한 후, distilled water로 최종액의 volume이 50μl가 되게 하였다.

PCR 혼합물은 Perkin-Elmer 2400 thermal cycler (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)를 사용하여, 94℃에서 3분간 pre-denaturation 시킨 후, 94℃에서 30초 denaturation, 55℃에서 30초 annealing, 72℃에서 30초 extension의 반응을 1cycle로 하여, 30cycle을 반응시켰다. 그리고, 72℃에서 7분간 post-extension시켰다.

Multiplex PCR은 시간적, 경제적인 절약을 위해 각각의 *tet* gene에 대해 특이적으로 반응하는 sense primer들과 antisense primer들을 한꺼번에 넣고 실시하였으며, PCR 조건은 위와 동일하였다.

PCR 후 증폭 산물은 0.5×TAE buffer (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA)를 전기영동을 위한 완충액으로 하여, 0.5μg/μl EtBr (Ethinium Bromide)가 첨가된 1% agarose gel상에서 전기 영동한 후, UV 검출기 (Seoulin Scientific Co., Ltd.)를 이용하여, ultraviolet상에서 검출되는 band와 그 크기를 관찰하여 증폭 여부와 *tet* gene의 종류를 확인하였다.

4. Gel Elution

PCR 생성물을, Prep-A-Gene DNA purification kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 agarose gel로부터 분리·정제하였다.

먼저, 전기영동으로 확인된 DNA가 포함된 gel의 band를 절단하여 새 microtube에 옮긴 후, binding buffer 500 μ l를 첨가하여 37℃에서 10분간 반응시켜 PCR 생성물이 들어있는 gel을 녹인다. 그리고 matrix 15 μ l를 첨가하고, 실온에서 5분간 반응시킨 후, 12,000 rpm, 1분간 원심 분리한다. Gel 성분이 포함된 상정액을 모두 제거하고, 다시 binding buffer 375 μ l를 첨가하여, 같은 방법으로 원심분리하고, 상정액을 제거한다. 침전된 matrix에 washing buffer 375 μ l를 첨가하여, 같은 방법으로 원심 분리하고 상정액을 제거하는 과정을 2회 거친 후, pellet을 실온에서 10분간 자연 건조시킨다. 건조시킨 침전물에 elution buffer 20 μ l를 첨가하여 현탁시킨 후, 37℃에서 10분간 반응시켰다. 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, DNA가 녹아 있는 상정액을 새 microtube로 옮겨, 사용 전까지 -20℃에서 보관하였다.

5. Cloning

정제한 DNA를, TOPO-TA Cloning Kit (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 cloning시켰다. Elution 과정을 통해서 정제된 DNA 4 μ l를 새 microtube로 옮긴 후, salt solution 1 μ l, TOPO vector 1 μ l, distilled water 4 μ l를 첨가하여 상온에서 30분간 반응시켰다. 다음에, competent cell (*E. coli* DH5 α -T1) 50 μ l를 첨가하여 ice 내에서 20분간 반응시키고, 42 $^{\circ}$ C에서 30초간 heat-shock 시켰다. 바로 ice에 2~3분간 두었다가, SOC 배지 250 μ l 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C에서 90분간 진탕 배양시켰다. 배양액을 X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside, Sigma, USA) 40 μ g/ml과 Ampicillin 50 μ g/ml가 첨가된 Luria-Bertani 평판배지 (LB, Difco)에 도말하여, 37 $^{\circ}$ C에서 24시간동안 배양시킨 후, 파란색과 흰색의 집락이 증식하는 것을 확인하고 흰색으로 나타나는 집락을 선택하였다.

6. Plasmid 분리

배양된 흰색의 집락을 취하여, Ampicillin이 50 μ g/ml 첨가된 LB broth (Difco)에 집중한 후 24시간동안 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 배양액 1.5ml을 microtube에 옮기고, 12,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10분간 원심 분리하여 균을 모은 후, 상층의 배지 성분을 제거하였다. 균의 침전물에, 100 μ l ice-cold solution I (50mM glucose, 25mM Tris/Cl, pH 8.0, 10mM EDTA, pH 8.0)을 넣고, vortex를 사용하여 완전히 현탁시켰다. 현탁액에 200 μ l의 solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS)를 넣고, 5회 inverting하여 혼합한 후, ice에서 5분 동안 반응시켰다. 150 μ l ice-cold solution III (60ml 5M potassium acetate, 11.5ml glacial acetic acid, 28.5ml distilled water)를 첨가하고, 5회 inverting 하여 혼합한 후, ice에서 5분간 반응시켰다. 반응액을 12,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10분간 원심 분리하여 상층의 plasmid가 포함된 용액을 새 microtube에 옮겼다. Plasmid 용액에 동량의 Phenol : Chloroform : isoamylalcohol (24 : 25 : 1)을 넣고, vortex한 후, 12,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10분간 원심 분리하여, 상층의 DNA 용액을 새 microtube로 옮겼다. 2배 volume의 Ethanol과 0.3M Sodium acetate를 넣고, vortex로 혼합하여, -70 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 침전시켰다. 12,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10분간 원심 분리하여 상정액을 완전히 제거한 후, washing 과정으로 70% Ethanol 1ml을 첨가하고 12,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10분 동안 원심 분리하여, 상정액을 완전히 제거한 후, 실온에서 10분간 자연 건조시켰다. 건조된 plasmid에 20 μ g/ml RNase가 첨가된 TE buffer 50 μ l를 넣어주어 pellet을 녹인 후, 사용 전 까지 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

7. 염기 시열 분석

Big Dye Terminator Cycle DNA Sequencing Kit (ABI PRISM PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 분리된 plasmid 내에 insertion된 염기서열을 밝힌 후, 각각의 염기서열은 MACAW program (Version 2.0.5., National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 비교하였다.

8. *tet(M)*의 분자적 구조 분석

검출된 *tet(M)*의 분자적 구조와 그 기원을 밝히기 위하여, Genbank (NCBI)에서 여러 세균에 존재하는 *tet(M)*의 염기 서열을 MACAW program을 이용하여 비교하였다. *tet(M)*은 크게 conjugative transposon인 Tn916에서 기원한 것과 Tn1545에서 기원한 것으로 나눌 수 있는데, 우리나라의 *tet(M)*은 어떤 transposon으로부터 유래하였는지를 알기 위하여, 각각의 conserved region으로부터 제작된 forward primer인 TMF와, variable region으로부터 제작된 reverse primers인 TMRV1, V4를 이용하여, 세 개의 primers를 동시에 넣고 행해진 multiplex PCR로 어떤 유형의 *tet(M)*인지를 알아보고자 하였다. primer들의 상대적인 위치와 sequence는 다음과 같다 (Table 2, Fig. 6).

Table 2. Primers and expected sizes of amplicons in PCR to determine the type of *tet*(M)

Primer	Oligonucleotide sequence (5'-3')	Expected sizes	Origin	Position* (bp)
TMF	GAATCTGAACAATGGGAT			
TMRV1	CGTTTGCAGCAGAGGGAGG	534bp	<i>Tn</i> 1545	1044~1036
TMRV4	CATTCCACTTCCCAACGG	964bp	<i>Tn</i> 916	1476~1461

* Based on the sequence of *Tn*916 (accession no. X90939) and *Tn*1545 (accession no. X92947).

9. *Vibrio* spp.에서 분리한 *tet*(B)와 *tet*(M)의 상대적 위치 확인

Tet(B)와 *tet*(M)의 상대적인 거리 분석을 위하여, *tet*(B)와 *tet*(M)으로부터 각각 5' end 방향으로 향하는 reverse primer인 BRS1과 MRS1, 그리고 3' end 방향으로 향하는 forward primer인 BFS1과 MFS1을 제작하여, band가 나올 수 있는 가능성이 있는 경우의 수만큼 primer를 조합하여 PCR함으로써 두 gene사이의 위치적 관계를 파악하고자 하였다. primer의 상대적인 위치와 염기 서열은 다음과 같다 (table 3, fig. 1).

Table 3. Primers used in PCR to confirm the location of *tet(B)* and *tet(M)*

Primer	Direction	Oligonucleotide sequence (5' → 3')	Position (bp)	Expected size
BFS1	sense in <i>tet(B)</i>	CCTTACCAATGCAACCGGTG	1019~1039	unknown
BRS1	antisense in <i>tet(B)</i>	TGAAAGCAAACGGCCTAA	161~142	
MFS1	sense in <i>tet(M)</i>	GTGGAGAAATCCCTGCTC	1825~1843	
MRS1	antisense in <i>tet(M)</i>	GTAATTCCTCTCTGACG	164~148	

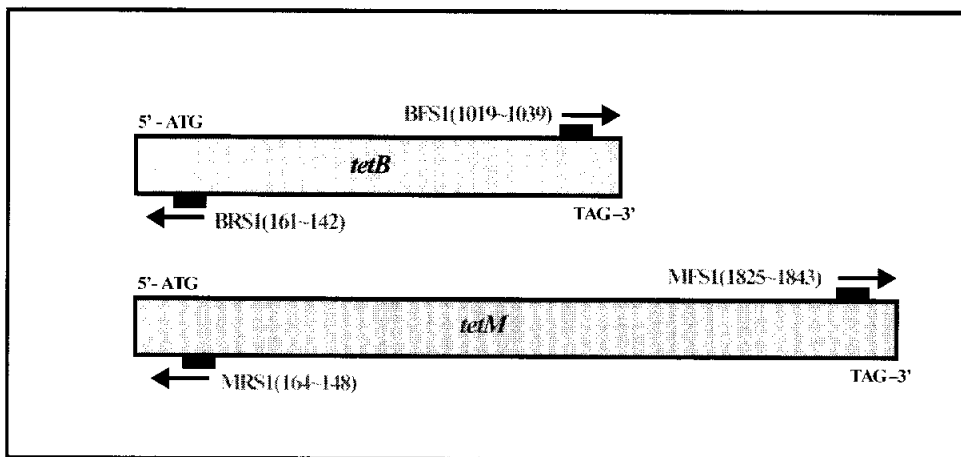


Fig. 1. Schematic illustration of the primer position for PCR to conform the location of *tet* genes.

III. 결 과

1. 내성 균주의 분리

1993년부터 2003년에 이르는 기간 동안, 병어, 해수 및 정상어의 장내 세균 총으로부터, 테트라사이클린 내성 세균을 분리할 수 있었으며, 각각 제주, 통영, 기재, 포항, 부산 등 동해안 및 남해안에 위치하는 어류 양식장으로부터 분리배양되었다.

분리균은 TSB 혹은 TSA 배지상에서 증식되었고, 선택배지인 TCBS와 Chromocult coliform agar (CC agar)를 사용하여 동정하였다. 분리된 *Vibrio* spp. 와 장내 세균 중에서 Tc에 대해 저항성을 나타내는 것은, 테트라사이클린이 10 μ g/ml 첨가된 MH agar를 이용하여 선별되었으며, 각 균주의 세부 동정은 API 20E system에 균을 접종한 후, 37℃에서 24~48시간 배양함에 따른 kit의 색 변화를 통하여 이루어졌다. Tc에 대한 내성 기준은 MIC로 나타내었으며, breakpoint 16 μ g/ml 이상 (NCCLS, 1993)으로 하였다. MIC 결과, Tc에 대해 16 μ g/ml의 값을 나타내는 총 32개의 Tc 내성 *Vibrio* spp.와, *Aeromonas hydrophilla* 1균주, *Edwardsiella tarda* 3균주, *Enterobacter cloacae* 2균주, *Morganella morganii* 3균주, *Proteus mirabilis* 2균주, *Shewanella* sp. 2균주, *Streptococcus* sp. 3균주 등 장내 세균 및 기타 세균으로써 총 16개의 균주를 분리할 수 있었다 (Table 3, 4).

Table 3. Tetracycline resistant *Vibrio* spp. isolated in Korea

Strains	Source	Area	Year
<i>Vibrio</i> sp. JE1	flounder	Namhae	1993
<i>Vibrio</i> sp. RV2	flounder	Namhae	1993
<i>Vibrio</i> sp. RV4	flounder	Namhae	1993
<i>Vibrio</i> sp., RV5	sea bass	Hadong	1993
<i>Vibrio</i> sp. RV11	flounder	Namhae	1993
<i>Vibrio</i> sp. RV16	flounder	Pohang	1993
<i>Vibrio</i> sp. YV1	flounder	Yeosu	1994
<i>Vibrio</i> sp. YV4	flounder	Yeosu	1994
<i>Vibrio</i> sp. YV5	flounder	Yeosu	1994
<i>Vibrio</i> sp. JV12	sea perch	Pohang	2001
<i>Vibrio</i> sp. JV13	flounder	Namhae	2001
<i>Vibrio</i> sp. JV14	mullet	Yeosu	2001
<i>Vibrio</i> sp. JV15	sea perch	Yeosu	2001
<i>Vibrio</i> sp. JV17	sea water	Jeju	2002
<i>Vibrio</i> sp. JV18	flounder	Jeju	2002
<i>Vibrio</i> sp. M1	flounder	Tongyeong	2002
<i>Vibrio</i> sp. M2	flounder	Tongyeong	2002
<i>Vibrio</i> sp. M3	sea water	Tongyeong	2002
<i>Vibrio</i> sp. M4	flounder	Tongyeong	2002
<i>Vibrio</i> sp. M5	flounder	Tongyeong	2002
<i>Vibrio</i> sp. GV2	sea perch	Geoje	2003
<i>Vibrio</i> sp. GV3	sea perch	Geoje	2003
<i>Vibrio</i> sp. GV4	sea perch	Geoje	2003
<i>Vibrio</i> sp. GV5	sea perch	Geoje	2003
<i>Vibrio</i> sp. KT1	sea perch	Geoje	2003
<i>Vibrio</i> sp. KT2	sea perch	Geoje	2003
<i>Vibrio</i> sp. KT3	sea perch	Geoje	2003
<i>Vibrio</i> sp. KT4	sea perch	Geoje	2003
<i>Vibrio</i> sp. KT5	sea perch	Geoje	2003
<i>Vibrio</i> sp. KT6	sea perch	Geoje	2003
<i>Vibrio</i> sp. KT7	sea perch	Geoje	2003
<i>Vibrio</i> sp. KT8	sea perch	Geoje	2003

Table 4. Tetracycline resistance enteric bacteria and other isolates in Korea

Strains	Source	Area	Year
<i>Edwardsiella tarda</i> R1	eel	Kwangju	1995
<i>Edwardsiella tarda</i> E31	flounder	Namhae	2001
<i>Edwardsiella tarda</i> E32	flounder	Guryongpo	2001
<i>Proteus mirabilis</i> P1	sea perch	Yeosu	2001
<i>Proteus mirabilis</i> P2	sea perch	Yeosu	2001
<i>Aeromonas hydrophila</i> A1	sea perch	Yeosu	2002
<i>Enterobacter cloacae</i> E1	sea perch	Geoje	2002
<i>Enterobacter cloacae</i> E2	sea water	Geoje	2002
<i>Shewanella</i> sp. S1	sea perch	Geoje	2002
<i>Streptococcus</i> sp. M14-1	flounder	Tongyeong	2002
<i>Streptococcus</i> sp. M14-2	sea water	Tongyeong	2002
<i>Morganella morganii</i> KT101	sea perch	Geoje	2003
<i>Morganella morganii</i> KT102	sea perch	Geoje	2003
<i>Morganella morganii</i> KT103	sea perch	Geoje	2003
<i>Shewanella</i> sp. S2	sea perch	Geoje	2003
<i>Streptococcus</i> sp. CJV23	flounder	Jeju	2003

2. PCR에 의한 tetracycline 내성 유전자의 증폭

2. 1. Multiplex PCR 기법을 통한 efflux *tet* gene의 검출

총 32개의 *Vibrio* spp.와 16개의 장내 세균 및 기타 세균의 total nucleic acid를 사용하여 tetracycline 내성 유전자의 유무와 그 종류에 대하여 조사하였다. 먼저 *tet* gene 중 efflux 기능을 수행하는 *tet*(A), *tet*(B), *tet*(C), *tet*(D), *tet*(E), *tet*(G)에 대한 실험으로, 이전의 연구에 따른 efflux gene의 multiplex PCR 기법을 이용하였다 (전, 2003). 먼저, 실험에 사용한 sense primer는, 여섯 개의 *tet* gene의 150bp 부위의 conserved region에서 제작되었고, 각 gene 별로 300~1000bp부위의 variable region을 특이적으로 제작하여 antisense primer로 사용하였다. 이렇게 제작된 primer들을 이용하여 multiplex PCR을 실시하였을 때, 각 내성 유전자들에 대해 특이적 PCR 산물을 얻는 것이 가능하였다.

실험 결과, *Edwardsiella tarda*에서는 *tet*(A), *tet*(B), 그리고 *tet*(D) 등이, *Aeromonas hydrophila*에서는 *tet*(C)가 검출되었으며, *Morganella morganii*에서는 *tet*(D), *Enterobacter cloacae*와 *Shewanella* sp.에서는 *tet*(B)가 검출되는 등, 장내 세균 및 기타 세균에서는 세균 종에 따라 다양한 efflux *tet* gene이 존재함을 알 수 있었다. 반면, 모든 *Vibrio* spp.에서는 PCR 결과 대략 200bp에 근접하는 band만을 확인할 수 있었는데, 즉 여섯 개의 efflux *tet* gene 중에서 *tet*(B)가 압도적으로 많이 존재하였다. Fig. 2는, 총 48개의 균주 중에서, 장내 세균 중 8개의 균주와, *Vibrio* spp.중에 6개의 균을 무작위로 선택하여 multiplex PCR한 결과이다. lane 1~6에서는, 각각 *tet*(A) (387bp),

tet(D) (489bp), *tet*(C) (631bp) 그리고 *tet*(B) (171bp)의 band들을 확인할 수 있었으며, lane 9~14에서는 *tet*(B) (171bp)의 band가 모두 나타났다.

Lane 7과 8의 *Streptococcus* sp. 균주에서는 Tc 내성은 존재하였지만, 여섯 개의 efflux gene 중 어느 것도 검출되지 않았으며, 각각의 *tet* gene에 대하여 multiplex PCR 하지 않고 단독으로 PCR 했을 때에도 동일한 결과를 얻을 수 있었다.

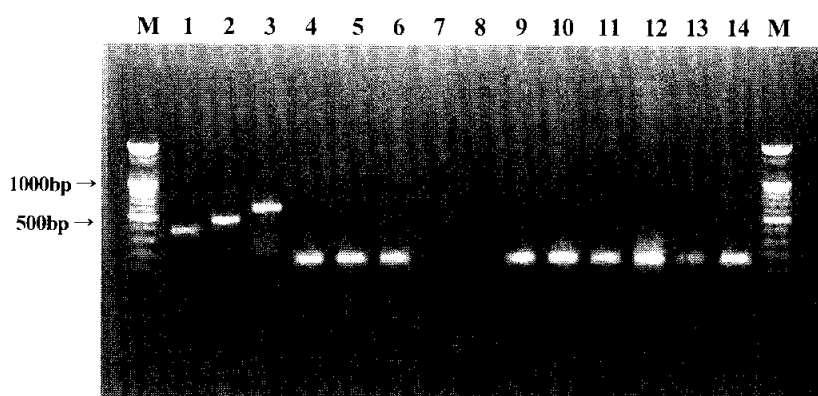


Fig. 2. Gel electrophoresis of amplicons generated by the multiplex PCR for efflux *tet* genes. lane1, *E. tarda* R1 ; lane2, *E. tarda* E31 ; lane3, *A. hydrophila* A1 ; lane4, *Enterobacter cloacae* E1 ; lane5, *E. tarda* E32 ; lane6, *Shewanella* sp. S1 ; lane7, *Streptococcus* sp. M14-1 ; lane8, *Streptococcus* sp. CJV23 ; lane9, *Vibrio* spp. RV16 ; lane10, *Vibrio* spp. RV2 ; lane11, *Vibrio* spp. JV17 ; lane12, *Vibrio* spp. JV13 ; lane13, *Vibrio* spp. YV1 ; lane14, *Vibrio* spp. JE1 ; M. 100bp DNA ladder.

2. 2. *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*의 확인

tet(A)~tet(G) 이외의 보편적인 efflux gene인 *tet(K)*와 *tet(L)*을 검출할 수 있는 primer sets와, 가장 대표적인 ribosomal protection gene인 *tet(M)*에 대한 primer set을 디자인하여, 총 6개의 특이적인 primers를 사용하여 한국에서 분리한 Tc 내성균의 total nucleic acid를 주형으로 하여 PCR을 실시하였다.

PCR 결과, 사용한 균주들 중, *Streptococcus* sp.인 M14-1과 CJV23에서 *tet(K)*과 *tet(M)*이 각각 검출되었으며, 다른 장내 세균들에서는 *tet(K)*, *tet(L)* 및 *tet(M)* 중의 어느 것도 확인할 수 없었다. 그러나 모든 *Vibrio* spp.에서는 대략 1.1kb의 band가 나타났으므로 *tet(M)*의 존재가 확인되었다.

Fig. 3은, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*의 6개의 primer들을 모두 사용한 PCR의 결과를 나타낸 것이다. lane 1~6에서는 세 개의 gene 중 어느 것도 확인할 수 없었고, lane 7에서는 TKF와 TKR의 반응 산물로서, 329bp의 *tet(K)*가, lane 8~14에서는 TMF와 TMR이 반응하여 1,099bp의 *tet(M)*이 검출되었다.

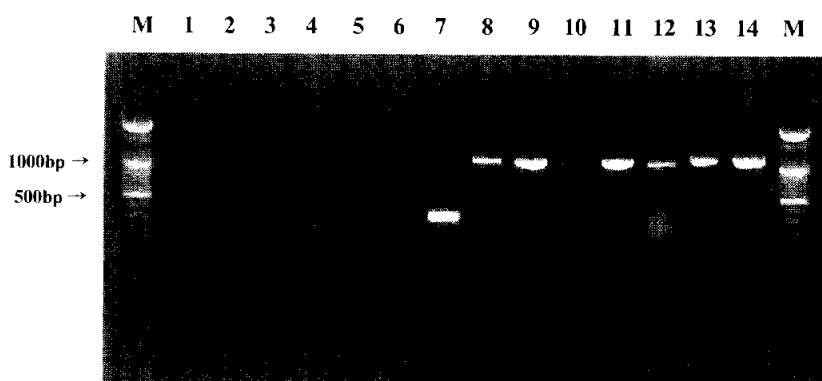


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of amplicons generated by multiplex PCR for *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*. lane1, *E. tarda* R1 ; lane2, *E. tarda* E31 ; lane3, *A. hydrophila* A1 ; lane4, *Enterobacter cloacae* E1 ; lane5, *E. tarda* E32 ; lane6, *Shewanella* sp. S1 ; lane7, *Streptococcus* sp. M14-1 ; lane8, *Streptococcus* sp. CJV23 ; lane9, *Vibrio* spp. RV16 ; lane10, *Vibrio* spp. RV2 ; lane11, *Vibrio* spp. JV17 ; lane12, *Vibrio* spp. JV13 ; lane13, *Vibrio* spp. YV1 ; lane14, *Vibrio* spp. JE1 ; M, 100bp DNA ladder.

2. 3. *Vibrio* spp. 내의 *tet*(B)와 *tet*(M)의 확증

앞선 두 PCR의 결과, 한국에서 채집된 모든 *Vibrio* spp.에서는 *tet*(B)와 *tet*(M)이 함께 존재함을 알 수 있었다. 이를 한번의 PCR로 확인해보기 위해, *tet*(B)를 검출하도록 디자인된 TETF-TBR1(5'-CTTCTATCAACAAGTATC-3') set와, *tet*(M)을 검출하기 위한 TMF-TMR primer들을 이용하였다. Primer들의 각 *tet* gene에 대한 특이성을 확인해 보기 위해, *tet*(B)만 (lane 1~3) 혹은 *tet*(M)만 (lane 4)이 검출되었던 균주들과 함께 PCR해서 *Vibrio* spp. (lane 5~10)의 PCR 결과와 비교해 보았다.

PCR의 결과가 Fig. 4에 나타나 있다. lane 1~3에서는 TETF와 TBR1이 595bp의 *tet*(B)를, lane 4에서는 TMF와 TMR이 1099bp의 *tet*(M)을 만들어냄을 확인할 수 있었고, lane 5~10에서는 *tet*(B)와 *tet*(M)의 band가 동시에 나타남으로써, *Vibrio* spp.에 두 gene이 존재함을 특이적으로 확인할 수 있었다.

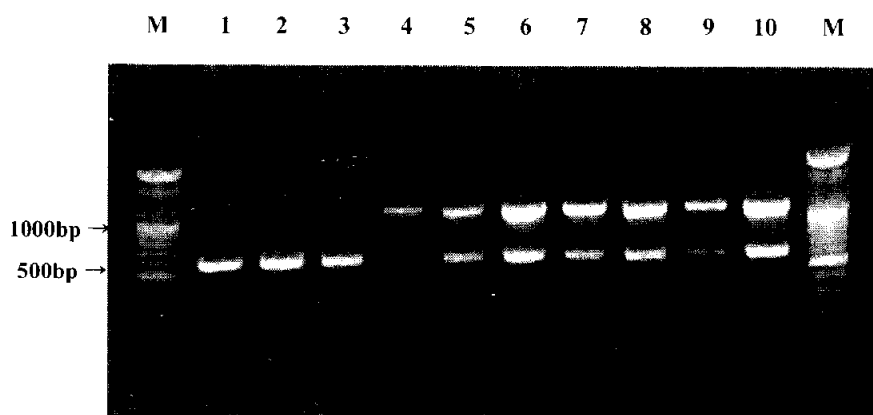


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of amplicons generated by the multiplex PCR. lane1, *Enterobacter cloacae* E1 ; lane2, *E.tarda* E32 ; lane3, *Shewanella* sp. S1 ; lane4, *Streptococcus* sp. CJV23 ; lane5, *Vibrio* spp. RV16 ; lane6, *Vibrio* spp. RV2 ; lane7, *Vibrio* spp. JV17 ; lane8, *Vibrio* spp. JV13 ; lane9, *Vibrio* spp. YV1 ; lane10, *Vibrio* spp. JE1 ; M, 100bp DNA ladder.

3. Ribosomal protection gene인 *tet(M)*의 분자적 구조 분석

3. 1. *tet(M)*의 염기 서열 분석

PCR 결과로 *tet(M)*의 존재가 확인된 *Streptococcus* sp. CJV23과 *Vibrio* spp.의 total nucleic acids를 주형으로 하여, *tet(M)*을 특이적으로 검출할 수 있도록 디자인된 TMF-TMR primer set으로 PCR을 실시하고, 증폭 산물을 정제하여 TOPO-TA vector에 cloning시킨 후, 염기서열을 분석하였다. 보고된 바에 의하면, *tet(M)*은 conjugative transposon인 Tn916 혹은 Tn1545에 위치하므로, Genbank (NCBI)로부터 Tn916상에 존재하는 *tet(M)*과 Tn1545상에 존재하는 *tet(M)*의 염기서열을 찾고, MACAW program을 이용하여 *Streptococcus* sp. CJV23 및 *Vibrio* spp. 중 하나인 *Vibrio damsela* RV16의 *tet(M)*의 전체 염기서열과 비교하였다 (Fig. 5).

*Tet(M)*의 structural gene 내에서의 비교 결과, Tn916의 *tet(M)*과 Tn1545의 *tet(M)* 사이에는 94.8%의 상동성을 나타내었다. *Streptococcus* sp. CJV23의 *tet(M)*은 Tn916의 *tet(M)*과, *Vibrio damsela* RV16의 *tet(M)*은 Tn1545의 *tet(M)*과 상대적으로 더 흡사하였으며, 상동성은 각각 99.3%와 99.7%이었다. 그리고, RV16과 CJV23을 비교하였을 때는, 94.4% 일치하였다.

RV16	ATG AAAATTA TTAATAITGG AGTTTITAGCT CATGTTTGATG CGGGAAAAAC TACCTTAACA GAAAGCMTAT TATAIAACAG	80
CJV23		80
Tn916		80
Tn1545		80
RV16	TGGAGCGATT ACAGAATTAG GAAGCGTGGG CAGAGGTACA ACGAAAAOOG ATAATACGCT TTTAGAACGT CAGACAGGAA	160
CJV23		160
Tn916		160
Tn1545		160
RV16	TTACAATTCA GACGGCGATA AOCCTTTTTT AGTGGAAAAA TACTAAGATA AACATCATAG ACACGCCAGG ACATATGGAT	240
CJV23		240
Tn916		240
Tn1545		240
RV16	TTTTTAGCAG AAGTATATOG TTCATTATCA GTATTAGATG GGGCAATTCT ACTGATTCTT GCAAAGATG CGGTACAAGC	320
CJV23	..C.....	320
Tn916	..C.....	320
Tn1545		320
RV16	ACAAACTOGT ATATTGTTTC ATGCACITAG GAAAATAGGT ATTCCACAA TCCTTTTTAT CAATAAGATT GAACAAAATG	400
CJV23		400
Tn916		400
Tn1545		400
RV16	GAATTGATTT ATCAACGGTT TATCAGGATA TTAAAGGGAA ACTTTCTGCG GAAATCTTAA TCAAACAGAA GGTAGAACTG	480
CJV23		480
Tn916		480
Tn1545		480
RV16	CATCCTAATA TCGGTGTAAT GAACITTAOC GAATCTGAAC AATGGGAT GTTAATAGAA GGAAATGATT ACCTTTGTGA	560
CJV23	T.....	560
Tn916	T.....	560
Tn1545		560
RV16	GAAATATACG TCITGGGAAT TATTGGAAGC ATTAGAACIC GAACAAGAGG AAAGCATAAG ATTTCATAAT TGTTCCCTGT	640
CJV23		640
Tn916		640
Tn1545		640
RV16	TCCCTGTTTA TCACCGAAGT GCAAAAAACA ATATAGGGAT TGATAACCTT ATAGAACTGA TTACCAATAA ATTITATTCA	720
CJV23		720
Tn916		720
Tn1545		720
RV16	TCAACACATC GAGGTCAGTC TGAACITTCG GGAAAGTTT TCAAAATTTA GTATTCCGAA AAAAGACAGC GTCTTCGATA	800
CJV23		800
Tn916		800
Tn1545		800

Fig. 5. Comparison analysis of the DNA nucleotide sequence of *tef(M)*.

RV16	TATACGTCCT TATAGTGGCG TACTGCATTT GCGAGATTGG GTTAGAATAT CGGAAAAGCA AAAAATAAAA ATTACAGAAA	880
CJV23	C... ..A.A..... A..... ..C... ..A...A..	880
Th916	C... ..A.A..... A..... ..C... ..A...A..	880
Th1545	C.....	880
RV16	TGTATACTTC AATAAATGGT GAATTATGTA AAATCGATAA GGCATATTCC GGGAAATIG TTATTITGCA GAATGAGTTT	960
CJV23	C.G..T...G A.....T ..A..... ..A.....	960
Th916	G..T...G A.....T ..A..... ..A.....	960
Th1545		960
← TMV1		
RV16	TTGAAGTTAA ATAGTGTCTT TGGAGATACA AAGCTATTGC CACAGAGAGA GAGAATTGAA AATCCCTTC CTTCTGTCGA	1040
CJV23	A..... ..A. AAG..... ..G.A.A..A..	1040
Th916	A..... ..A. AAG..... ..G.A.A..A..	1040
Th1545		1040
RV16	AAOCC TGTTT GAACCGAGCA AACCTCAACA AAGCGAAATG TTACTTGAIG CACTTTTAGA AATCTCGAC AGTGAOCCGC	1120
CJV23	..AA..... ..T.G... G..A..... ..G..... ..C.....G..A..TT....	1120
Th916	..AA..... ..T.G... G..A..... ..G..... ..C.....G..A..TT....	1120
Th1545	..A.....	1120
RV16	TTCTCGATA TTATGTGGAT TCTGGACAC ATGAATCAT ACTTTCCTTC TTAGGGAAG TACAAATGA AGTACTTGT	1200
CJV23	...A..... ..C..... ..A..... ..T..... ..T.A..	1200
Th916	...A..... ..C..... ..A..... ..T..... ..T.A..	1200
Th1545		1200
RV16	GCCTCGCTCC AGAANAATG TCTGTGGAG ATAGAATAA AAGAGCCTAC AGTCATTAT ATGGAAGAC CGTTAAAAA	1280
CJV23	..A...T... ..C..... ..G.....	1280
Th916	..A...T... ..C..... ..G.....	1280
Th1545		1280
RV16	AGCAGAGTAT ACCATTCACA TCGAGTTCC ACGAATCCT TTCGGGCTT CATTGGTCT ATCTGTAGCA CCGCTTCAT	1360
CJV23	T....A... ..G... G..A..... ..T..... ..T..... T.G	1360
Th916	T....A... ..G... G..A..... ..T..... ..T..... G	1360
Th1545		1360
← TMV4		
RV16	TAGGAGCGG AGTACAGTAT GAGAGCTGG TTCTCTTGS ATACTTAAAT CAATGTTTC AAAATGAGT TATGAGGGG	1440
CJV23	.G.A.T.. A.GG... ..A..... ..A...	1440
Th916	.G.A.T.. A.GA..... ..A...	1440
Th1545		1440
RV16	ATAOCTATG GCTGTACACA AGGATTGTAT GGTTCGAATG TGACCGACTG TAAATCTGT TTAAAGTATG GCTTATACTA	1520
CJV23	T..C..... ..A..... ..T.....	1520
Th916	T.....	1520
Th1545		1520
RV16	TAGCCTGTIT AGTACCCGAG CAGATTITCG GATGCTTGGT CCTATTGTAT TGGACAGCT CTAAAAAA CGTGAACAG	1600
CJV23		1600
Th916		1600
Th1545		1600

Fig. 5. *Continued.*

RV16	AATGTATAG	GCCATATCTT AGTTTAAAA TTATAGCGCC ACAGGAATAT CTTCACGAG CATACACGA TGCCTCTAA	1680
CJV23			1680
Th916			1680
Th1545			1680

← **TR**

RV16	TATTTGTGCGA ACATCGTAGA CACTCAATTG AAAATAATG AGGTCAITCT TAGTGGAGAA ATCCCTGCTC GGTTATITCA	1760
CJV23		1760
Th916		1760
Th1545		1760

RV16	AGATATCTGT AGTATTTTAA CTCTTTTAC AAATGACGT AGTGTGTGT CACACAGIT AAAAGGTAC CATGTTACTA	1840
CJV23	T.....	1840
Th916	T.....	1840
Th1545	T.....	1840

RV16	CCGCTGAACC TGTTTGGCAG CCCCCTGCTC CAATATAGTC GATAGATAAA GTACCATATA TGTTCATATA AATAAC TAG	1920
CJV23		1920
Th916		1920
Th1545		1920

Fig. 5. *Continued.*

3. 2. *tet*(M)의 type 구별

염기서열의 분석을 통하여, 한국에서 분리된 *tet*(M)이 Tn916과 Tn1545 중 어떤 transposon에서 기원한 *tet*(M)인지를 추측해 볼 수 있었다. 그러나, 해양 환경 중에 존재하는 수많은 세균들에 존재하는 *tet*(M)을 모두 염기서열 분석하기에는 시간적·경제적인 어려움이 있으므로, 한번의 PCR로써 두 type의 *tet*(M)을 구별해보고자 하였다.

이를 위해, 두 가지 type의 *tet*(M)의 conserved region에서 forward primer인 TMF를 제작하고, variable region에서 reverse primer인 TMRV1, TMRV4를 각각 증폭산물의 크기가 534bp, 964bp로 나르게 산출되도록 제작하여 (Fig. 6), 세 개의 primer를 한꺼번에 넣고 PCR을 실시하였다. PCR 결과, lane 1의 *Streptococcus* sp. CJV23은 TMRV4와 반응하여 964bp의 band가, *Vibrio* spp.들은 TMRV1과 반응하여 534bp의 band가 만들어졌다. 이는 염기서열 분석 결과와 동일하였으며, 한번의 PCR로써 어떤 transposon으로부터 유래한 것인지, *tet*(M)의 기원을 추측하는 것이 가능하였다 (Fig. 7).

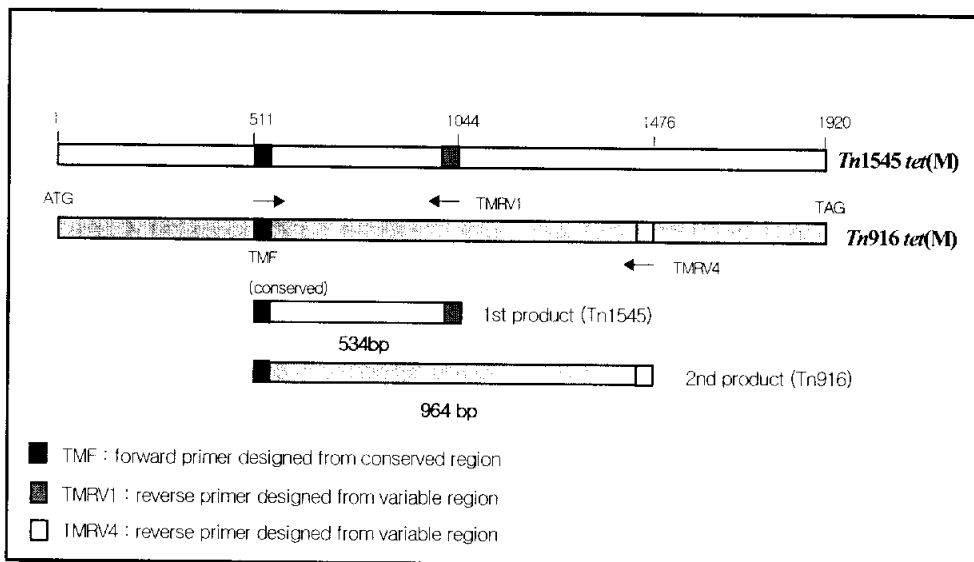


Fig 6. Schematic illustration of the primer position for multiplex PCR. One pair of primers (TMF and TMRV1) yield a 534bp segment after PCR amplification. The other pair of primers (TMF and TMRV4) yield a 964bp amplicon.

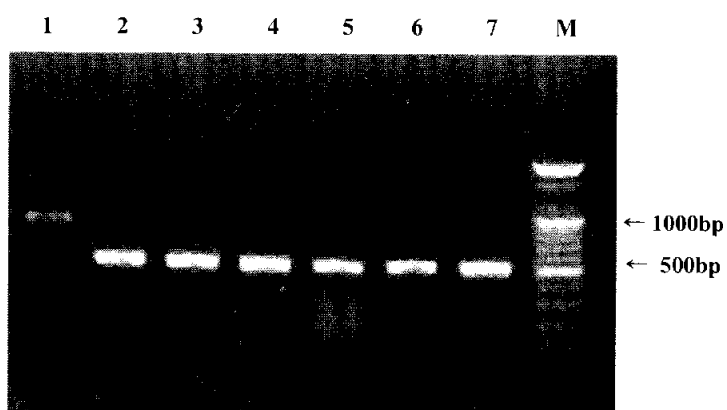


Fig. 7. Amplicons of different size in multiplex PCR to determine the type of *tef(M)*. lane1, *Streptococcus* sp. CJV23 ; lane2, *Vibrio* spp. RV16 ; lane3, *Vibrio* spp. RV2 ; lane4, *Vibrio* spp. JV17 ; lane5, *Vibrio* spp. JV13 ; lane6, *Vibrio* spp. YV1 ; lane7, *Vibrio* spp. JE1 ; M, 100bp DNA ladder.

3. 3. *Vibrio* spp.의 *tet(M)* 분석

PCR 결과, 모든 *Vibrio* spp.는 Tn1545 type인 것으로 나타났다. PCR 결과를 다시 확인해보기 위해서, 지역과 시기에 상관없이 부작위로 몇 개의 *Vibrio* spp.를 선택하여 정제한 후 cloning하여 염기서열을 분석한 후, MACAW program을 사용하여 증폭 산물 내 염기서열을 서로 비교·분석하였다.

분석 결과, 각각의 *Vibrio* spp.에서 분리한 *tet(M)*은 모두 100% 일치하거나, 단 2개의 base만이 달랐을 뿐 나머지 부위는 모두 같아서, 같은 type의 transposon으로부터 유래된 *tet(M)*임을 알 수 있었다 (Fig. 8).

RV16	GAATCTGAC	AAATGGCAT	GGTAATAGAA	GGAATGAT	ACCTTTTGG	GAAATATACG	TCCTGGGAAT	TAATGGGAAGC	80
RV2									80
M4			..A						80
JV17									80
YV1									80
MF →									
RV16	ATTAGAACTC	GAACAAGAGG	AAAGCATAAG	ATTTCATAAT	TGTTCCCTGT	TCCCTGTTTA	TCACGGAAGT	GCAAAAAACA	160
RV2									160
M4							T		160
JV17									160
YV1									160
RV16	ATATAGGGAT	TGATAACCTT	ATAGAAGTGA	TTACGAATAA	ATTTTATTCA	TCAACACATC	GAGGTGAGTC	TGAACTTTGC	240
RV2									240
M4									240
JV17									240
YV1									240
RV16	GGAAGAGTTT	TCAAAATTGA	GTATTGGGAA	AAAAGACAGC	GTCTGCATA	TATACGTCTT	TATAGTGGCG	TACTGCATTT	320
RV2									320
M4									320
JV17									320
YV1									320
RV16	GCGAGATTGG	GTTAGATAT	CGGAAAGGA	AAAAATAAAA	ATTACAGAAA	TGTATACTTC	AATAAATGGT	GAATTATGTA	400
RV2									400
M4									400
JV17									400
YV1									400
RV16	AAATCGATAA	GGCTTATTC	GGGAAATTTG	TTATTTTTC	GAATGAGTTT	TTGAAGTTAA	ATAGTGTCT	TGGAGATACA	480
RV2									480
M4									480
JV17									480
YV1									480
RV16	AAGCTATTGC	CACAGAGAGA	GAGAAATTGA	AATCCCTTCC	CTCTGTGTGA	AAAGGCTGTT	GAACCGAGCA	AACCTCAACA	560
RV2									560
M4									560
JV17									560
YV1									560
RV16	AAGGGAATG	TTACTTGATG	CACTTTTAGA	AATCTCCGAC	AGTGACCCOC	TTCTGCGATA	TTATGTGGAT	TCCTGGACAC	640
RV2									640
M4									640
JV17									640
YV1									640
RV16	ATGAATCAT	ACTTCTTTC	TTAGGGAAG	TACAAATGGA	AGTGACTTGT	GCTCTGCTGC	AAGAAAAGTA	TCATGTGGAG	720
RV2									720
M4									720
JV17									720
YV1									720

Fig. 8. Comparison analysis of DNA nucleotide sequence of *tet(M)* in *Vibrio* spp.

RV16	ATAGAAATAA	AAGAGCCTAC	AGTCATTAT	ATGGAAAGAC	CGTTAAAAAA	AGCAGAGTAT	ACCATTGACA	TGGAAGTTCC	800
RV2									800
M4									800
JV17									800
YV1									800
RV16	ACOGAATCCT	TTCTGGGCTT	CCATTGGTCT	ATCTGTAGCA	CCGCTTCAT	TAGGGAGGG	AGTACAGTAT	GAGAGCTGG	880
RV2									880
M4									880
JV17									880
YV1									880
RV16	TTTCCTCTGG	ATACTTAAT	CAATCGTTTC	AAATGCAGT	TATGGAGGG	ATACGCTATG	GCTGTGAACA	AGGATTGTAT	960
RV2									960
M4									960
JV17									960
YV1									960
RV16	GGTTGGAAATG	TGACGGACTG	TAAATCTGT	TTTAAGTATG	GCTTATACIA	TAGCCCTGTT	AGTACCCCAG	CAGATTTTTG	1040
RV2									1040
M4									1040
JV17									1040
YV1									1040
						← TMR			
RV16	GATGCTTGCT	CCATTGTGAT	TGGAACAAGT	CTTAAAAAA	GCTGGAACG	AAATGTTTG			1099
RV2									1099
M4									1099
JV17									1099
YV1									1099

Fig. 8. *Continued.*

4. *Vibrio* spp.에서 검출된 *tet*(B)와 *tet*(M)의 관계 분석

4. 1. *tet*(B)와 *tet*(M)의 거리 확인

Vibrio spp.에 존재하는 테트라사이클린 내성 유전자인 *tet*(B)와 *tet*(M)의 상대적인 거리 분석을 위하여, *tet*(B)와 *tet*(M)으로부터 각각 5' end 방향으로 향하는 reverse primer인 BRS1과 MRS1을, 그리고 3' end 방향으로 향하는 forward primer인 BFS1과 MFS1을 제작하여, 교차적으로 PCR함으로써 두 gene사이의 위치적 관계를 파악하고자 하였다.

그 결과, BFS1과 MRS1을 넣고 행한 PCR에서 대략 2.9kb의 증폭 산물이 나타남으로써, gene 내에서 primer들의 위치를 감안했을 때 (Fig. 1) 대략 2.6kb의 거리를 두고 *tet*(B)와 *tet*(M)이 동일 DNA 선상에 위치하고 있음을 알 수 있었다. Lane 5-9의 모든 *Vibrio* spp.에서 동일한 크기의 amplicon이 생성되었으며, lane 1-3의 *tet*(B)만 있는 균주이거나 lane 4의 *tet*(M)만 있는 균주의 total nucleic acid를 주형으로 PCR하였을 때는 band가 나타나지 않았다 (Fig. 9).

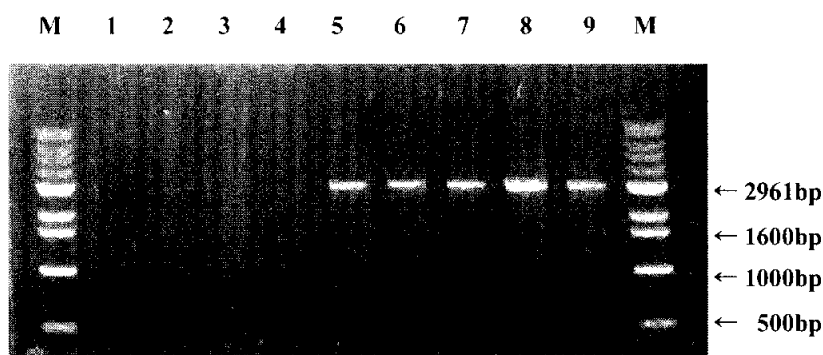


Fig. 9. Agarose gel electrophoresis of amplicons using the PCR to determination the relative location of *tet(B)* and *tet(M)*. lane1, *Enterobacter cloacae* E1 ; lane2, *E. tarda* E32 ; lane3, *Shewanella* sp. S1 ; lane4, *Streptococcus* sp. CJV23 ; lane5, *Vibrio* spp. RV16 ; lane6, *Vibrio* spp. JV17 ; lane7, *Vibrio* spp. JV13 ; lane8, *Vibrio* spp. YV1 ; lane9, *Vibrio* spp. JE1 ; M, 100bp DNA ladder.

4. 2. *tet(B)*와 *tet(M)* 사이의 염기 서열 분석

대략 2.9kb의 PCR 생성물을 정제하고, cloning하여 염기 서열을 분석하고 genbank (NCBI)의 염기서열과 비교하였다.

분석 결과, *tet(B)*와 *tet(M)*의 거리는 2,536bp였다. *Vibrio* spp.의 *tet(B)*의 첫 부분은, Tn10의 *tet(B)*의 첫부분과 100% 일치하였다. Tn10에는 insertion sequence인 IS10이 transposon의 right end와 left end에 서로 inverted repeating되어서 존재하며, transposon의 다른 균 내로의 insertion에 관련된 기능을 수반한다. 염기 서열 분석으로, *Vibrio* spp.의 *tet(B)*와 *tet(M)* 사이에 IS10-right가 있음이 확인되었다. IS10 첫부분으로, 14bp의 거리를 두고, *tet(M)*의 leader peptide와 *tet(M)*이 동일 DNA 전상에 존재하였다 (Fig. 10).

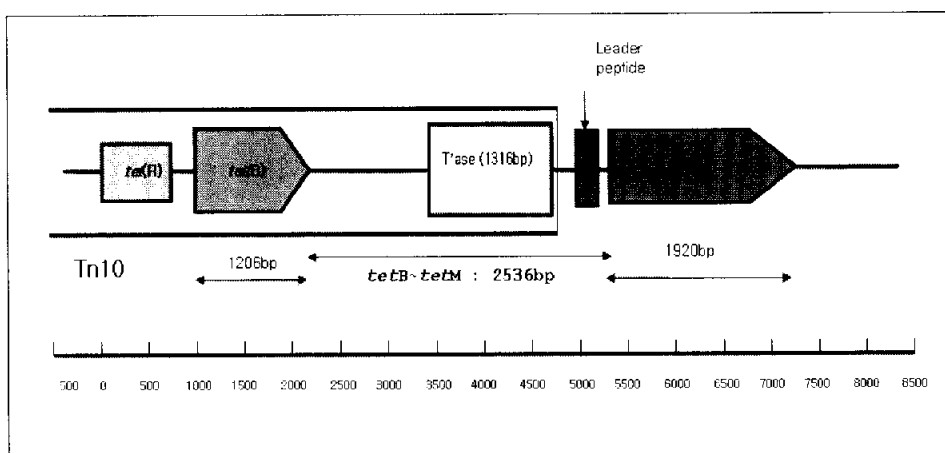


Fig. 10. Schematic illustration of the relative location between *tet(B)* and *tet(M)*.

IV. 고 찰

1929년 플레밍에 의해 Penicillin이 발견되고, 1940년대에 세균성 질병의 치료제로서 실제 사용된 이후, 오늘날까지 항생제는 사람 및 어류를 포함한 동물과 식물의 질병의 치료를 위해 많이 사용되고 있으며, streptomycin, tetracycline, chloramphenicol을 비롯한 수많은 항생제가 개발되었다. 이들 항생 물질은 모두 처음에는 곰팡이나 세균 등을 분리, 정제한 것이었으나, 최근에는 분자의 화학적 변형을 통한 인공 합성으로 새로운 항생제가 개발되기에 이르렀다 (마, 1988). 항생제는 질병 치료에 좋은 효과를 보여주고 있으며, 세균성 질병에 대한 화학요법제로서 가장 널리 사용되어 그 생산량 및 사용량은 막대하다. 어류 양식 산업에서도 세균성 질병으로 인한 경제적 손실이 심각하기 때문에, 치료와 구제를 위하여 항생제에 대부분 의존하고 있는 실정이다.

세균성 질병의 치료에 없어서 안 될 항생제는, 종류도 많고 그에 따른 특성도 다양하다. 하지만, 항생제의 남용 및 오용으로 인하여, 약제 내성 세균의 출현 및 분포의 확대, 약제의 어체 내 잔류 그리고 세균간의 교차 내성의 발생 등 많은 문제점들이 발생하고 있다. 특히 여러 종류의 새로운 항생제의 개발에 따라, 여러 항생제에 대해 저항성을 나타내는 내성 균주가 출현하였는데, 모든 병원성 세균들은 비록 그 정도의 차이는 있으나, 여러 항생제에 대해 내성을 획득할 수 있으며, 새로운 항생물질에 대하여 곧바로 내성을 가지게 되는 경우 또한 빈번하다 (송과 이, 1996).

이렇듯 많은 이점과 함께 부수적인 문제점을 가지고 온 항생제에 대해서는 작

용 기작, 작용 범위, 약동역학 및 내성을 가지게 하는 원인 등에 대해 체계적인 연구가 필요한 실정이지만, 대부분의 항생제의 작용 기작 및 특성들에 관한 연구는 포유류에 대해서만 많이 이루어져, 어류에 대한 항생제의 영향과, 어류에 질병을 일으키는 세균의 특성에 대해서는 아직도 밝혀야 할 부분이 많다. 따라서, 본 연구에서는 우리나라의 병어, 해수 등 다양한 수생 환경 중에 존재하는 대표적인 어병 세균인 *Vibrio*과, 해수 어류의 장에 존재하는 장내 세균들을 분리하고, *Vibrio* spp.의 tetracycline 내성상의 특징과 대표적인 *tet* gene의 분자적인 구조에 대해 조사하여 어병 세균에 있어서의 테트라사이클린 내성에 대해 이해해보고자 하였다.

Tc 내성 조사를 위하여, 1993년에서 2003년에 이르는 기간 동안 해수, 해산 어의 장 및 병어로부터 어병 세균을 분리하였다 (table 3, 4). 분리한 세균들 중 가장 다수를 차지하는 *Vibrio* spp.는 (table 3), 수중에 산재하고 있으며, 어체가 약해지는 경우나 환경 악화에 의한 스트레스 조건 하에서 질병을 야기할 수 있는 병원성을 지닌 세균이다 (Berg, 1995). 이러한 *Vibrio* spp.에는 *V. cholerae*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*, *V. furmissii*, *V. hollisae*, *V. damsela*, *V. alginolyticus* 등 많은 종류가 존재하고 있으며, 척추동물과 어류를 비롯한 무척추동물의 표면이나 내부 장기에 집락을 형성한다 (Zanetti *et al.*, 2001).

Tc 내성 조사를 위하여, 1993년에서 2003년에 이르는 기간 동안, 해수, 해산 어류의 장 및 병어로부터 세균을 분리하였다. 그 중, 미브리오를 검출함에 있어서는, TCBS상에 도말하고 직온에서 24~48시간동안 배양한 후, 노란색 혹은 초록색의 집락을 선별하여 배양하는 방법으로써 미브리오를 분리하는데

(Zanetti *et al.*, 2001), 본 연구에서도 이와 같은 방법을 통하여 *Vibrio* 균주들을 정의하였고, 필요에 따라, API 20E system (Biomérieux, France)을 통하여 동정하였다.

Vibrio spp. 세부 종 사이의 항생제 내성은 차이가 있으나, 대부분 모든 strain들은 chloramphenicol, tetracycline, aminoglycoside, quinolones, β -lactam계 항생제에 대해 감수성이 있는 것으로 알려져 있다 (Zanetti *et al.*, 2001). 그러나, Liu *et al.* (1997)에 의하면, *V. alginolyticus* 및 *V. parahaemolyticus*와 같은 몇몇 종에서는, chloramphenicol, tetracycline, cefotaxime과 같은 항생제에 대해서 다제 내성을 나타낸다고 한다. 1993년에서 2003년 동안 채집된 전체 *Vibrio* 균주의 약제 감수성 실험 결과, chloramphenicol에 대해서 전체 *Vibrio* spp.의 7.69%, tetracycline에 대해서는 50%, 그리고 ampicillin에 대해서는 69.23%가 내성을 지니고 있었다. 시기와 채집 장소에 따라 다소 차이가 존재하였으나, 여러 항생제에 대하여 내성을 나타내는 다제 내성 *Vibrio* spp.들이 존재하였으며, 그 종류도 *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* 및 *V. damsela* 등으로 다양하였다 (DATA not shown).

세균 내에 존재하는 항생제 내성 유전자의 검출을 위한 방법으로 PCR 기법이 사용되고 있는데, Worsa *et al.* (1996), Hanse *et al.* (1996) 등의 연구 및 여러 연구에서 PCR 기법을 이용하여 내성 유전자를 검출하였고, 본 연구에서도 *Vibrio* spp. 내의 *tet* gene의 존재를 확인하기 위해 PCR 기법을 사용하였다. Tetracycline에 대해 저항성이 있는 *Vibrio* spp.의 경우, 내성 유전자로서 *tet*(A), *tet*(B), *tet*(C), *tet*(D), *tet*(E), *tet*(G) 등이 존재한다는 것이 이미 보고

된 바 있다 (Chopra *et al.*, 2001 ; Zhao & Aoki, 1992). 그러나 본 연구에서 multiplex PCR 기법 (전, 2003)을 사용하여 한국의 *Vibrio* spp.를 분석한 결과, efflux gene 중에서는 *tet(A)*에서 *tet(G)*의 모두가 검출된 것이 아니라, *tet(B)*만이 검출되었으며, 특이하게도 ribosomal protection gene인 *tet(M)*이 검출되었다. *Tet(M)* gene은 맨 처음 gram 양성 세균인 *Streptococci*에서 발견되었으며 (Hartley *et al.*, 1984), *Gamella*, *Listeria*, *Staphylococci*, *Clostridium*, *Enterococci* 등 다수의 gram 양성 세균에서 보고되었다. *Eikenella*, *Kingella*, *Neisseria*를 포함한 다수의 gram 음성 세균이 가지고 있는 *tet(M)*이 보고된 바 있으나, 비브리오 균에서 *tet(M)*이 발견된 경우는 드물다. 2003년 Nonaka *et al.*에 의해 *Vibrio* sp.에서 발견된 *tet(M)*의 structural gene의 일부분의 염기서열이 genbank (NCBI)에 등록되었다 (accession no. AB124557, unpublished). 보고된 structural gene의 염기서열을 우리나라에서 분리된 *Vibrio damsela* RV16의 염기서열과 비교했을때, 99.3%의 상동성이 있었고, variable 부위는 Tn1545와 일치하였으나, Tn916 type과 Tn1545 type에서 variation이 나타나지 않는 부위에서 염기 서열에 차이가 나타남으로써, 새로운 type의 *tet(M)*이라 할 수 있다. 본 연구에서 밝혀진 비브리오의 *tet(M)*은 보고된 Tn1545의 염기서열과 매우 흡사하며, *tet(B)*와 *tet(M)*이 동시에 나타난 특이한 경우이다.

*Tet(M)*의 내성 기작은 tetracycline으로부터 세균의 ribosome을 보호하는 것으로, 이는 minocycline이나 doxycycline과 같은 tetracycline의 analog들에 대해서도 마찬가지로 기능을 한다 (Speer *et al.*, 1992). *Tet(M)*은 transposable element인 conjugative transposon에 위치하고 있기 때문에, 중

간에 혹은 종 내에서의 이동이 가능하다 (Courvalin, 1994). 일반적으로 plasmid상에 존재하는 내성 유전자는 Gram 양성 세균과 Gram 음성 세균 사이에서 효과적으로 전이되거나 복제되지 못하는 반면, *tet(M)*은 plasmid에 존재하는 다른 내성 유전자들보다 더 광범위한 숙주 간에서 이동할 수 있으며, *tet(M)*을 지닌 Tn916의 경우는, 자연적으로 종간으로 전이될 뿐 아니라, gram 양성 세균들 사이 혹은 gram 음성 세균들 사이 뿐 아니라, gram 양성 세균과 음성 세균 사이에서도 이동 및 복제가 가능하다 (Bertram *et al.*, 1991). 여러 종의 세균으로부터 염기서열의 일부가 다른 몇 가지 다른 type의 *tet(M)*이 발견되었으며, 이들은 모두 밀접하게 연관된 단백질을 만들어 낸다는 것이 보고되었다 (Sanchez-Pescador *et al.*, 1988). 대표적인 예로, Tn916과 Tn1545의 structural *tet(M)* gene의 염기 서열 사이에는 94%의 유사성이 있으며, 같은 transposon상에 존재하는 *tet(M)*일지라도, 다른 종의 세균에 존재하는 것들 사이에는 다소 차이가 있어, 98~99%의 유사성이 나타났다.

본 연구에서는 두 가지 type의 *tet(M)*이 발견되었는데, 염기서열의 유사성의 정도를 보아 *Streptococcus* sp. CJV23의 *tet(M)*은 Tn916과, *Vibrio* spp. 의 *tet(M)*은 Tn1545와 상대적으로 더 흡사하였다. 그러나, Tn916과 흡사한 CJV23은, structural gene의 일부분이 *Streptococcus pneumoniae*의 *tet(M)* (Martin *et al.*, 1996 ; accession no. X04388)과 *Staphylococcus aureus* (Nesin *et al.*, 1990 ; accession no. M21136)의 *tet(M)*의 두 가지 type의 *tet(M)*이 섞여있는 모자이크 구조로 되어있음을 알 수 있었다. 여러 *tet(M)*의 nucleotide sequence를 비교해보면, CJV23의 *tet(M)*과 같이 모자이크 구조로 되어 있거나, *tet(M)* gene 내에 돌연변이가 일어난 구조들이 다소 관찰되는데

(Oggioni *et al.*, 1996), 대표적이며 가장 많이 연구된 *tet(M)*인 Tn916 및 Tn1545의 *tet(M)* 외에도 *tet(M)*의 allele에는 *Neisseria gonorrhoeae*의 pOZ100 *tet(M)* 및 pOZ101 *tet(M)* (Gascoyne-Binzi *et al.*, 1993), *Streptococcus pneumoniae* Tn5251의 *tet(M)*, *Ureaplasma urealyticum*의 *tet(M)* (Sauchez-Pescador *et al.*, 1988a) 그리고 *Neisseria meningitidis*의 pOZ105 *tet(M)* (Gascoyne-Binzi *et al.*, 1994b)등이 있다.

이러한 사실을 바탕으로 하여 본 연구에서는, PCR로서 어떤 type의 *tet(M)*과 흡사한지를 알고, 어떤 transposon으로부터 유래하였는지 그 기원을 추적해보고자 하였다. 따라서 *tet(M)*의 염기서열 분석 후, 각각의 conserved region으로부터 제작된 forward primer와, variable region으로부터 제작된 reverse primer들을 이용하여, 우리나라에서 분리된 세균들의 total nucleic acid를 이용하여 PCR을 실시했을 때, 대부분의 *Vibrio*들의 *tet(M)*은 Tn1545 type으로 나타남으로써, 그 Tn1545를 가지고 있던 세균으로부터 *tet(M)*을 포함한 일부 분이 전이되어 tetracycline에 대한 내성을 가지게 되었음을 짐작할 수 있었다. 그러나, *Vibrio*의 *tet(M)*이 어떤 세균으로부터 전이되었는지를 알기에는, 한국에서 분리한 어망 세균들 중 *tet(M)*만 가지고 있는 세균의 존재가 너무나 적었기 때문에 추측하기 어려웠으며, 단 하나 발견된 CJV23의 *tet(M)*의 경우도 염기서열이 Tn1545 type이 아닌 Tn916에 가까웠으므로 추측이 불가하였다. 따라서, 한국에서 분리한 *Vibrio*의 *tet(M)*이 어디에서 기원되었는가를 알기 위해서는, gram 양성 세균 및 음성 세균 전반에 걸쳐 *tet(M)*의 분포에 관한 조사 작업이 이루어져야 할 것이라고 생각된다.

본 연구에서는, *Vibrio* spp.에서, efflux gene인 *tet(B)*와 ribosomal

protection gene인 *tet(M)*이 동시에 존재함을 보였는데, *tet(B)*와 *tet(M)*이 동시에 존재한다는 이전의 보고는 없었으나, 이와 흡사하게 *Acinetobacter baumannii*를 실험 균주로 사용하였을 때, efflux gene의 하나인 *tet(A)*와 *tet(M)*이 함께 존재한다는 보고가 있었다 (Riberta *et al.*, 2003). 기존의 *A. baumannii*에서는, *tet(A)* 혹은 *tet(B)*가 단독으로 존재하는 경우가 많았으나, 처음으로 *tet(A)*와 함께 *tet(M)*이 같이 있는 내성균주가 발견되었는데, 이 균주의 *tet(M)*은 보고되어 있는 *S. aureus* (Genbank accession no. AP00359)의 *tet(M)*의 염기서열과 100% 일치하였으며, 이는 Gram 양성 세균 기원인 gene 이 Gram 음성 세균으로 옮겨간 대표적인 예시이다.

한국에서 분리한 *Vibrio* spp.에 존재하는 두 가지 *tet* gene이 어느 정도의 내성을 나타내는지, 활성화가 있는지를 확인하기 위하여, *Vibrio* spp. 의 *tet(B)*와 *tet(M)*의 염기서열 분석 후, *tet(M)*만을 TOPO TA vector에 cloning하고 *E. coli* DH5a에 transformation하였다 (DATA not shown). 만약 두 개의 gene중 어느 하나가 발현하지 않는다면, 내성 정도의 차이가 있을 것이라고 추측하고, tetracycline (Tc) 및 tetracycline의 analog인 minocycline (M)에 대한 MIC값을 측정하였다. 실험 결과, 원래 *Vibrio*에 비하여, 그 정도는 감소하였으나, *tet(B)*만 옮긴 것이나 *tet(M)*만을 옮긴 것이나 Tc 및 M에 대한 내성이 존재하였다. 그러나, 원래 균주에 비해서는 다소 내성이 감소하는 경향을 나타내었는데, 이는 *Vibrio*에서 *E.coli*로 옮겨갔기 때문에 균주의 차이 때문일 것으로 여겨지나, 이에 관해서는 자세한 연구가 필요할 것이다. 이와 흡사한 맥락에서, 2003년 Riberta *et al.*의 실험에서도, *tet(A)*와 *tet(M)*이 함께 존재하는 *A. baumannii* 균주에서 *tet(M)*만의 내성 정도와 활성화의 정도를 알기 위해,

tet(M) gene 만을 vector에 cloning하여, *E. coli* DH5α에 transformation하는 실험을 했는데, 본 연구와 마찬가지로 내성의 차이가 *Vibrio*와 *E. coli*사이 나타났으며, minocycline의 내성은 *tet(A)*는 원래 minocycline에 대한 내성이 없으므로 *tet(M)*으로부터 기인한 것으로 간주하였다. 그러나, *Vibrio* spp.의 *tet(B)*는 원래 efflux gene중에서는 특이하게도 minocycline에 대한 내성이 존재하는 gene이기 때문에, 한국의 *Vibrio*에서 나타나는 minocycline의 내성은 *tet(B)*와 *tet(M)* 중에 어느 gene에서 유래한 것인지는 알 수 없었다. 이것을 알기 위해서는, mRNA detection 등의 실험이 더 필요할 것이라 여겨진다.

본 연구에서는, efflux gene인 *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(G)* 이외에도, 다른 efflux gene인 *tet(K)*, *tet(L)*에 관하여 특이적인 primer를 제작하여 PCR하였다. 그 결과, *tet(L)*은 검출되지 않았으나, *tet(K)*만이 존재하는 *Streptococcus* sp. 균주를 다소 얻을 수 있었다. *Tet(K)*와 *tet(L)*은, plasmid상에 혹은 chromosome상에 존재하며, 종종 Gram 양성 세균에서 발견된다 (Rodriguez-Avial *et al.*, 2003). 이는, tetracycline과 doxycycline에 대해서는 efflux 기능을 하지만, minocycline에 대해서는 내성을 나타내지 못한다. 실험에 사용한 균주들의 minocycline 감수성 실험 결과, *tet(K)*만 지니고 있는 *Streptococcus* sp. 균은 M에 대해 내성이 없었으나, *tet(B)*나 *tet(M)* 중 하나만 있거나 *tet(B)*와 *tet(M)*이 함께 있는 경우에는, M에 대해 내성을 나타내었다. 1996년 Warsa *et al.*의 *tet(K)*와 *tet(M)*에 관한 실험 결과에 따르면, *tet(K)*와 *tet(M)*이 함께 존재하는 경우가 한국에서는 0%, 중국에서는 100%이며 일본에서는 0.8%정도 나타난다고 보고한 바 있다. 마찬가지로 본 연구에서도 *tet(K)*와 *tet(M)*이 함께 존재하는 균주는 없었으며, 실험 목록에 포함된 균주 뿐 아니

라, 다른 채집균주들에서도 *tet(K)*와 *tet(M)*이 함께 존재하는 경우는 없었고, *tet(K)*는 minocycline에 대해 감수성을 나타내었다.

우리나라에서 분리된 *Vibrio* sp.에서 발견된 *tet(B)*는 보고된 바에 의하면 Tn10상에 존재하며, 높은 level의 Tc 내성을 나타내고, 앞부분에 Tet R이 존재하여 Tet B와 Tet R 전체의 transcription을 멈추게 하는 기능을 수행한다 (Lawley *et al.*, 2000). 본 연구에서 *Vibrio*의 *tet(B)* 또한 upstream region에 Tet R이 존재하였으며, *tet(B)*와 *tet(M)*의 사이 염기 시열이 GenBank에서 비교해 본 결과, Tn10의 right region의 염기서열과 일치하였으므로, Tn10의 존재 또한 추측해 볼 수 있었다. 그러나, Genbank에서 *tet(B)*의 염기시열을 얻어 (accession no. J01830) 제작한 여러 set의 primer로 PCR을 실시했을 때, Tet R의 존재는 확실하였으나, 그 앞부분의 PCR 생성물은 균주별로 다소 차이가 있었는데, 장내세균의 경우 expected size의 amplicon이 생성되었으나, *Vibrio* spp.에서는 다소 짧거나 증폭 산물이 생성되지 않아, *Vibrio* spp. 내의 완전한 Tn10의 존재는 확신할 수 없었다 (Data not shown).

Tn10은, *E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Vibrio* spp., *Salmonella*와 같은 광범위한 장내 세균들에서 발견된 바 있으며, composite transposon으로서, Tc 내성 유전자가 Insertion sequence인 IS10 element 사이에 위치하고 있다. Tn10은 장내 세균인 *Shigella flexneri*로부터 기원하였으며, 전체 9147bp이고 9개의 ORF로 구성되어 있다 (Chalmers *et al.*, 2000). Tn10은, plasmid와 관련 있는 element로서, 세균의 conjugation에 의해 전이가 가능하다. 그러나, transmission의 범위가 좁아 예를 들어 *Vibrio*에 존재하는 Tn10은 동일균주로만 전이되지만, 다른 Gram 음성 세균으로의 전이는 이

렸다. 본 연구에서는 *tet(B)*와 *tet(M)*이 동시에 존재하는 *Vibrio* 균주를 확인하였으며, 앞의 사실을 토대로 하였을 때 Tn10 상에 존재하는 *tet(B)*는 동일균주로부터, Tn1545와 염기서열이 같은 *tet(M)*의 경우는 다른 gram 양성 세균으로부터 전이되었다고 추측이 가능하지만, 분석결과 Tn1545중에서도 *tet(M)*만이 존재하는 일부분만이 insertion되어 있었으므로 *tet(M)*의 전이에 대한 이해를 위해서는 *tet(M)*의 downstream region을 포함한 염기서열과 그 기능이 더 분석되어야 할 것이며, 테트라사이클린 내성 균주간의 *tet(M)*의 전이와 *tet(M)* gene의 발현에 관련된 많은 연구가 뒤따라야 할 것이다.

V. 요약

테트라사이클린 (Tc)은 전 세계의 수산업에서 가장 많이 사용되고 있는 항생 물질이다. 테트라사이클린을 비롯한 테트라사이클린계 약물의 사용은 테트라사이클린 내성 유전자 (*tet* gene)을 지닌 내성균의 출현을 야기시켰다. 따라서 *tet* gene의 분자적 특성에 관한 이해는, 어병 세균에서의 테트라사이클린 내성 세균의 발생에 대해 이해하기 위해 매우 중요하다.

한국의 수생 환경중의 *tet* gene의 분포를 PCR 기법으로 결정해보기 위해서, 한국 근해로부터, 수년에 걸쳐 테트라사이클린에 내성을 나타내는 32종의 *Vibrio* spp.와 16종의 장내 세균을 분리하였다. Efflux gene인 *tet*(A), *tet*(B), *tet*(C), *tet*(D), *tet*(E) 그리고 *tet*(G)을 검출하기 위한 multiplex PCR 방법에 의해 분리 균주들을 테스트한 결과, 장내 세균에서는 다양한 종류의 *tet* gene이 검출되었으나, *Vibrio* sp.에서는 여섯 개의 *tet* gene 중 *tet*(B) 만이 나타났다. 또 *tet*(K), *tet*(L) 및 *tet*(M)에 대한 특이적인 primer를 사용하여 분리 균주들을 시험해본 결과, 장내 세균 중에서 *tet*(K)와 *tet*(M)을 지닌 균이 각각 1균주씩 검출되었고, 놀랍게도 모든 *Vibrio* spp.에서는 ribosomal protection gene인 *tet*(M)이 검출되었다. 따라서 한국에서 발견된 모든 *Vibrio* spp.에서는, *tet*(B)와 함께 *tet*(M)이 테트라사이클린 내성 인자로서 존재한다는 것을 알 수 있었다.

두 가지 주요한 *tet*(M)인 Tn916과 Tn1545의 *tet*(M)의 염기 서열의 conserved region과 variable region으로부터 증폭산물의 크기가 다르도록 제작된 primer들을 이용하여 multiplex PCR을 실시한 결과, 한국의 수생 환경에서 분리된 모든 *Vibrio* sp.는 Tn1545에서 유래된 *tet*(M)을 지니고 있었음이 확인되었다. 반면, 장내세균의

하나인 CJV23의 경우, Tn916으로부터 유래된 *tet(M)*을 지니고 있었으며, *Vibrio* spp.와 CJV23의 *tet(M)*의 염기 서열을 분석하여 보고되어 있는 Tn1545 및 Tn916의 *tet(M)*과 비교하였다.

*Tet(B)*와 *tet(M)*에서 제작된 primer들을 조합하여, DNA 선상에서 두 유전자의 방향과 거리에 따라 PCR의 증폭 산물이 생성되도록 하여, *tet(B)*와 *tet(M)*의 상대적인 거리에 대해 알아보려고 하였다. 그 결과, *tet(B)*상의 한 primer와 *tet(M)*상의 한 primer에 의해 증폭산물이 생성되었으며, 분석 결과, *tet(M)*은 *tet(B)*의 3' end와는 2,536bp 떨어진 거리에 위치하고 있었으며, *tet(B)*를 포함하고 있는 Tn10의 바로 뒤에 위치하고 있었다. 본 연구는, *Vibrio* spp.에서의 *tet(M)*의 발견에 대한 최초의 보고이며, *tet(M)*의 전이와 발현에 대한 더 많은 연구가 필요할 것으로 여겨진다.

VI. 감사의 글

벌써 졸업입니다. 저의 2년간의 대학원 생활은, 돌아보면 즐기웠던 기억도, 힘들었던 기억도 많았었습니다. 그동안 제가 잘 해나갈 수 있도록 도와주신 많은 분들과 좋았던 기억들을 생각해보면 세삼 가슴이 뜨거워집니다.

2년간 많은 가르침을 주시고, 때로는 잘못을 매섭게 꾸짖으셔 눈물짓게도 하셨지만, 항상 제자를 배려하시고 아껴주시는 큰 사랑을 보여주신 지도교수님이신 정현도 교수님 너무나 감사드립니다. 그리고 저의 부족한 논문을 바쁘신 와중에도 검토해주시고 미처 생각하지 못했던 점을 깨우쳐주신, 김기홍 교수님과 박수일 교수님 정말 감사드립니다. 또, 항상 노력하시는 모습으로 제자들의 본보기가 되어 주신 정준기 교수님, 허민도 교수님, 강주찬 교수님께도 감사를 드립니다.

제가 논문을 쓰고, 즐거운 학교생활을 할 수 있었던 것은 한 가족이나 다름없는 진단생화학 실험실 모두의 덕택이었습니다. 먼저, 야무지게 실험이나 생활에서 많은 것을 가르쳐주신 수희언니, 후배를 아껴주시고 예쁜 장을 보여주신 광규선배·남실언니, 항상 제게 많은 사랑을 아낌없이 주신 은아언니, 이것저것 물어봐도 귀찮다 하지 않고 가르쳐주신 명석선배, 후배를 아껴 주시고 실험함에 있어 많은 도움을 주신 준효선배, 지를 차매치럼 대해준 영이언니, 웃음과 깊은 마음으로 상냥하게 대해준 주영언니, 남다른 방법으로 지를 이뻐해주신 종영선배, 영재선배, 우연선배, 상냥한 지윤언니 감사합니다. 또, 누구보다도 실험에 대한 열정으로 저의 본보기가 되고 도움이 되어준 큰형님 준범선배, 생활 하나 하나부터 실험의 모든 것에 이르기까지 많은 도움을 주고, 마치 친언니처럼 평소에도 부진장 동생을 아껴준 려진언니, 함께 지내면서, 너그러운 마음과 재미를 주고, 웃음을 주고, 깨달음을 주고, 실험함에 있어 배울 점을 느끼게 해준 재훈선배, 준범선배, 호열선배에게도 감사드립니다. 또, 부지런하고 애살 많은 학부생 생활에 이어, 앞으로 우리 방을 멋지게 이끌어 줄, 신후선배, 현정아, 지효에게 감사드립니다. 그리고 올 방의 꽃은일을 열심히 도와주고 있는 상훈아, 영수, 은혜 그리고 혜진아와, 지금은 실험실에 없지만 저를 무지 많이 도와줬던 현선이, 정원이, 영아, 윤성이, 은영이에게도 감사하고 싶습니다.

저의 실험이 잘 되도록 많은 도움을 주신 잉기선배, 문준선배와, 대학원 생활을 함께 하며 좋은 일을 함께 나누었던 대학원 동기 소징이언니, 현숙이언니, 대국선배, 상환선배, 재영이언니께도 감사의 마음을 전합니다. 그리고, 저와 함께 즐거워하고 울고 웃었던 성령이언니 고맙습니다. 대학생활과 대학원 생활동

안 제 생활에 도움을 주신 선·후배님들이 너무나 많으신데, 일일이 감사의 말을 전하지 못하는 점이 너무나 죄송스럽습니다만 고마웠던 기억들을 잊지 않겠습니다.

서로 기쁨을 나눌수 있는 진한 친구로 함께 실험하며 많은 도움과 힘이 되어준 대심이에게 졸업 축하와 고마움을 전합니다. 친구의 고민을 덜어주고 항상 희망을 주고 자신감을 북돋아주었던 경진아, 민선이, 현임이, 혜정이언니, 효실이, 연재의 사랑과 고마움도 너무너무 큼니다. 함께 대학원 생활하며 힘이 되고 고충을 나누었던 승엽아, 혜정이, 은네짱, 현징이, 비주에게도 감사하며, 병욱이를 비롯한 수산생명의학과 98동기들 모두모두 사랑하고 앞으로도 우정 영원하길 바랍니다.

저의 가장 좋은 친구이자, 힘들 때 힘이 되어주고, 기꺼이 저를 위해 마음씀을 아끼지 않았던, 사랑하는 친구 정아, 언제나 노력하는 모습으로 친구를 채찍질 해주었던 멋진 친구 희원이, 영란이에게도 말할수 없을 만큼 고마움이 많습니다. 그리고, 공부에 힘겨워하는 친구의 투정을 들어주고 자기일마냥 걱정해주었던 혜영이, 은영이, 민경이, 마진이와, 운명의 반쪽 명화와, 우정에는 시간이 중요한게 아니라는 것을 알게 해 준 착한 은비에게도 감사합니다. 또 대학 때부터 많은 즐거움과 기쁨을 주고, 힘들 때 기댈 수 있고, 쉴 수 있게 해주었던, 태현선배, 싱건선배, 찬준선배를 비롯한 멋진 낙시 동문인들에게 감사드리며, 특히 비화, 진영, 윤주, 주연, 명주, 형욱, 효장 등 동문 동기들에게도 감사의 마음을 전합니다.

마지막으로, 저에게 무엇보다도 바꿀 수 없는 사랑하는 저의 가족에게 감사와 사랑의 마음을 전하고자 합니다. 스스로 시작할 때가 가장 좋은 때라는 것을, 힘든 회사생활 와중에서도 대학원 공부에 힘쓰심으로써 보여주신, 때로는 엄격하지만 우리를 아껴주시는 아빠, 저의 가장 큰 발벗이자, 지식의 근원이며 힘든 생활에 힘든 내색 한번 없으시면서 매일 웃음으로 사랑의 의미를 보여주시는 멋진 엄마, 말할 수 없고 표현할 수 없지만 누나를 사랑하고 누나에게 깨달음을 주는 종화, 많은 나이차에도 가끔은 어린 면이 있는 언니를 잘 도와주는 막내민화, 모두모두 사랑합니다!! 그리고 큰 손너를 믿어주시고 아껴주시는 할아버지, 할머니, 외할머니와 지 못지않게 저의 학문에 열의를 가져주시는 외할아버지께도 감사합니다. 저를 지금까지 있게 해 주시고, 응원해주시고, 도와주신 사랑하는 가족에게 작지만 2년간의 노력이 담긴 저의 논문을 바치며, 이 글을 마무리하고자 합니다.

VI. 참고 문헌

- Agerso, Y., L. Jensen, M. Givskov and M. Roberts, 2002. The identification of a tetracycline resistance gene *tet*(M), on a Tn916-like transposon, in the *Bacillus cereus* group. *FEMS microbiology letters*, 214, 251-256.
- Aoki, T., 1988 Drug resistant plasmids from fish pathogens. *Microbiol. Sci.*, 5, 219.
- Berg, O., 1995. Bacteria associated with early life stages of halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., inhibit growth of a pathogenic *Vibrio* sp. *J. Fish Dis.*, 18, 31-40.
- Bertram, J., M. Stratz and P. Durre, 1991. Natural transfer of conjugative transposon Tn916 between gram-positive and gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.*, 173, 443-448.
- Brown, J. T. & M. C. Roberts, 1987. Cloning and characterization of *tet* M gene from a *Ureaplasma urealyticum* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 31, 1852
- Burdett, V., 1980. Identification of tetracycline resistant mediated at the level of protein synthesis. *J. Bacteriol.*, 165, 564
- Burdett, V. & J. Inamine, 1982. Heterogeneity of tetracycline resistance determinants in *Streptococcus*. *J. Bacteriol.*, 149, 995
- Celli, J. & P. Trieu-Cuot, 1998. Circularization of Tn916 is required for

expression of the transposon-encoded transfer functions : characterization of long tetracycline-inducible transcripts reading through the attachment site. *Molecular microbiology*, 28(1), 103-117.

Chalmers, R., S. Sewitz, K. Lipkow and P. Crellin, 2000., Complete nucleotide sequence of Tn10. *Journal of Bacteriology*, 182, 2970-2972.

Chen, W. & T. Kuo, 1993. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Research*, 21, 2260.

Chopra, I. & M. Roberts, 2001. Tetracycline antibiotics : mode of actions, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*, 65, 232-260.

Courvalin P., 1994. Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 38, 1447-1451.

Clewell D. B. & C. Gawron-Burke, 1986. Conjugative transposon and the dissemination of antibiotic resistance in streptococci. *Annu. Rev. Microbiol.*, 40, 635-659.

Gascoyne-Binzi, D., J. Heritage and Hawkey, 1993. Nucleotide sequence of the *tet(M)* genes from the American and Dutch type tetracycline resistance plasmids of *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 32, 667-676.

Hanse, L. M., P. C. Blanchard and D. C. Hirsh, 1996. Distribution of

- tet(I)* among *Pasteurella* isolates from United States and Canada. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40, 1558-1560.
- Knapp, J. S. & S. R. Johnson, 1988. High-level tetracycline resistance due to Tet M in strains of *Neisseria* species, *Kingella dentrificans* and *Eikenella corrodens*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 32, 765
- Lawley, T. D., V. Burland and D. E. Taylor, 2000. Analysis of the complete nucleotide sequence of the tetracycline-resistance transposon Tn10. *Plasmid*, 43, 235-239.
- Levy, S. B., 1988. Tetracycline resistance determinants are wide spread. *ASM News*, 54, 418
- Levy, S. B. & L. M. McMurry, 1989. Nomenclature for tetracycline resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33, 1373
- Levy, S. B., 1992. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 36, 695-703.
- Levy, S. B., L. M. McMurray, T. M. Barbosa, V. Burdett, P. Courvalin, X. Hillen et al., 1999. Nomenclature for new tetracycline resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43, 1523-1524.
- Liu, P. C., K. K. Lee and S. N. Chen, 1997. Susceptibility of different isolates of *Vibrio Harvey* to antibiotics. *Microbios.*, 91, 175-180
- Mirandam C., C. Kehrenberg, C. Ulep, S. Schwarz and M. Roberts, 2003. Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from Chilean salmon farms. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47, 883-888.

- Morse, S. A. & Johnson, S. R., 1986. High-level tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* is result of acquisition of streptococcal Tet M determinant. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 30, 664
- Oggioni, M., C. Dowson, J. Smith and G. Pozzi, 1996. The tetracycline resistance gene *tet(M)* exhibits mosaic structure. *Plasmid*, 35, 156-163.
- Olsivik, B., F. C. Tenover and J. K. Olsen, 1996. Three subtypes of the *tet(M)* gene identified in bacterial isolates from periodontal pockets. *Oral Microbiology and immunology*, 5, 299-303.
- Riberta, A., J. Ruiz and J. Vila, 2003. Presence of the Tet M determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47, 2310-2312.
- Roberts, A., P. Johanesen and J. Rood, 2001. Comparison of Tn5397 from *Clostridium difficile*, Tn916 from *Enterococcus faecalis* and the CW459*tet(M)* element from *Clostridium perfringens* shows that they have similar conjugation regions but different insertion and excision modules. *Microbiology*, 147, 1243-1251.
- Roberts, M. C., 1990. Characterization of the Tet M determinant in urogenital and respiratory bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 34, 476.
- Roberts, M. C. and S. L. Hillier, 1990. Tetracycline resistance and *tet M* in pathogenic urogenital bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30, 810.

- Roberts, M., 1996. Tetracycline resistance determinants : mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS microbiology reviews*, 19, 1-24.
- Rodriguez-Avial, I., C. Rodriguez-Avial, E. Culebras and J. Picaso, 2003. Distribution of tetracycline resistance genes *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(L)* and *tet(K)* in blood isolates of viridans group streptococci harbouring *erm(B)* and *mef(A)* genes. Susceptibility to quinupristin/dalfopristin and linezolid. *International journal of antimicrobial agents*, 21, 536-541.
- Sasaki, Y., K. Yamamoto, Y. Tamura and T. Takahashi, 2001. Tetracycline-resistance genes of *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum* and *Clostridium sordellii* isolated from cattle affected with malignant edema. *Veterinary Microbiology*, 83, 61-69.
- Snachez-Pescador, R., J. T. Brown, M. Roberts and M. S. Urdea, The nucleotide sequence of the tetracycline resistance determinant tetM from *Ureaplasma urealyticum*. *Nucleic. Acids Res.*, 16, 1216-1217.
- Speer, B. S., N. B. Shoemaker and A. A. Sayers, 1992. Bacterial resistance to tetracycline : mechanisms, transfer and clinical significance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 5, 387-399.
- Taylor, D. and A. Chau, 1996. Tetracycline Resistance Mediated by Ribosomal Protection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40, 1-5.
- Teo, J., T. Tan and C. Poh, 2002. Genetic determinants of tetracycline resistance in *Vibrio harvey*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46,

1038-1045.

Wang, Y. and D. Talyor, 1991. A DNA sequence upstream of the *tet(O)* gene is required for full expression of tetracycline resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 35(10), 2020-2025.

Warsa, U., M. Nonoyama, T. Ida and M. Inoue, 1996. Detection of *tet(K)* and *tet(M)* in *Staphylococcus aureus* of Asian countries by the polymerase chain reaction. *The journal of antibiotics*, 49, 1127-1132.

Xia, M., Y. Pang and M. Roberts, 1995. Detection of two groups of 25.2 MDa Tet M plasmids by polymerase chain reaction of the downstream region. *Molecular and cellular probes*, 9, 327-332.

Zanetti, S., T. Spanu, A. Deriu, L. Romano and G. Fadda, 2001. In vitro susceptibility of *Vibrio* spp. isolated from the environment. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17, 407-409.

Zhao, J. and T. Aoki, 1992. Nucleotide sequence analysis of the class G tetracycline resistance determinant from *Vibrio anguillarum*. *Microbiology Immunology*, 36, 1051-1060.

김정수, 은소희, 이성미, 황평한, 정원일, 이해수 : 병원감염을 일으키는 주요 원인균의 항생제 내성 연구. 전주의대논문집, 제22권, 11-20, 1988.

김명석 : 환경적 변화에 따른 나일 틸라피아의 oxolinic acid 흡수와 배설. 부경대학교 어병학과 석사논문, 1997.

마점술 : 항생제 및 약품에 대한 내성세균의 분제. 한국영양사료학회지, 제12권, 58-68, 1988.

박인담, 김광혁, 장명웅, 박영숙 : Tetracycline 저항성 세균에서 *tetM* 유전자의 분포, 대한미생물학회지, 제27권, 59-72, 1992.

송재훈, 이종현 : 항균제내성 폐렴구균 감염증의 치료, 대한화학요법학회지, 제14권, 161-171, 1996.

유민호 : 어병 세균에서 Chloramphenicol 내성 유전자 분포와 R plasmid, 부경대학교 어병학과 석사논문, 2000.

전려진 : 우리 나라 어병세균이 갖는 *tet* 유전자의 특성 분석, 부경대학교 어병학과 석사논문, 2003.

정현도, 전세규 : 항생제 사용과 세균성 어류질환의 치료, 한국어병학회지, 제5권, 37-48, 1992.